

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-502533

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成6年(1994)3月24日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/87	Z N A		
A 0 1 H 5/00	Z N A A	8502-2B	
C 1 2 N 5/10			
		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00 A
		9281-4B	5/ 00 C
		審査請求	未請求 予備審査請求 有 (全 28 頁)

(21)出願番号	特願平4-500303
(86) (22)出願日	平成3年(1991)11月21日
(85)翻訳文提出日	平成5年(1993)5月24日
(86)国際出願番号	P C T / E P 9 1 / 0 2 1 9 8
(87)国際公開番号	W O 9 2 / 0 9 6 9 6
(87)国際公開日	平成4年(1992)6月11日
(31)優先権主張番号	9 0 4 0 3 3 3 2 . 1
(32)優先日	1990年11月23日
(33)優先権主張国	欧州特許機構 (E P)
(31)優先権主張番号	9 1 4 0 1 8 8 8 . 2
(32)優先日	1991年7月8日
(33)優先権主張国	欧州特許機構 (E P)

(71)出願人	プラント・ジエネティク・システムズ・エヌ・ベー ベルギー国、1040・ブリュッセル、コロネル・ブルフストラート・106
(72)発明者	ダリュアン、カトリーン ベルギー国、9030・マリアケルケ、ホーイランド・48
(72)発明者	ゲーベル、エルケ ベルギー国、9000・ゲント、ヨゼフ・クルイスケンシユトラート・9
(74)代理人	弁理士 川口 義雄 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 単子葉植物の形質転換方法

(57) 【要約】

緻密な胚形成カルスを形成することが可能な植物の無傷組織又は緻密な胚形成カルスそれ自体の細胞を損傷及び／又は分解することにより単子葉植物、特に穀類を形質転換する新規方法。

請求の範囲

1. 単子葉植物、特にイネ科植物、特定的にはトウモロコシ、コムギ、イネ、エンバク、オオムギ、モロコシ、ライムギ及びアワのような穀類植物、より特定的にはトウモロコシをDNA、ゲノム特に核ゲノムで形質転換するための方法であって、a) 緻密な胚形成カルスを形成することが可能な前記植物の無傷組織又は前記植物の前記無傷組織から得られた緻密な胚形成カルス、特にその胚形成セクターを損傷及び/又は分解させ、i) 前記DNAの取り込み、ii) 前記植物ゲノムにおける前記DNAの組込みの形質転換及びiii) 前記細胞からの前記植物の再生に関して前記無傷組織又はカルスの細胞をコンピテントにする段階と、b) 前記コンピテント細胞を前記DNAで形質転換する段階と、次にc) 形質転換された前記コンピテント細胞から正常表現型雄性成熟植物のような正常表現型植物として前記植物を再生させる段階とを含む方法。

2. 最大寸法0.1~5mm、好ましくは1~2.5mm、特に1.25~1.75mmに切断することにより前記無傷組織を損傷させ、こうして生成された前記コンピテント細胞を形質転換することを特徴とする請求項1に記載の方法。

に記載の方法、

7. 前記カルスを酵素で処理することにより分解して前記カルスの細胞壁に穴を明け、次いでこうして生成された前記コンピテント細胞を形質転換することを特徴とする請求項1に記載の方法。

8. 前記コンピテント細胞を直接遺伝子移入、特にエレクトロポレーションにより形質転換することを特徴とする請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

9. 植物中で発現可能なDNA、特にキメラ遺伝子で組込み的に形質転換されたゲノム、特に核ゲノムを有するイネ科植物、特定的には穀類、より特定的にはトウモロコシ又はイネであって、Dattaら(1990) Bio/Technology 8:736、Shimamotoら(1989) Nature 338:274、Gordon-Kammら(1990) The Plant Cell 2:603及びFrommら(1990) Bio/Technology 8:833により記載されているような従来の培養条件下においては、1) 前記DNAの取り込み、2) 前記植物ゲノムへの前記DNAの組込みの形質転換及び3) 前記DNAで形質転換された正常表現

法、

3. 前記無傷組織を切断することにより損傷させた後、酵素で処理することにより分解し、好ましくは前記無傷組織の細胞壁に穴を明け、次にくこうして生成された前記コンピテント細胞を形質転換することを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。

4. 前記植物がトウモロコシであり、無傷未成熟トウモロコシ胚を酵素で処理することにより分解し、好ましくは前記胚の細胞壁に穴を明け、次にくこうして生成された前記コンピテント細胞を形質転換することを特徴とする請求項1に記載の方法。

5. 前記カルスを最大長0.5~2.5mm、特に1~2mm、特定的には1.25~1.75mm、及び好ましくは最小長約0.1mmに切断することにより損傷させ、次にくこうして生成された前記コンピテント細胞を形質転換することを特徴とする請求項1に記載の方法。

6. 前記カルスを切断することにより損傷させた後、酵素で処理することにより分解し、好ましくは前記カルスの細胞壁に穴を明け、次にくこうして生成された前記コンピテント細胞を形質転換することを特徴とする請求項1又は5

型雄性植物としての前記植物の再生に関してコンピテントな前記植物の胚形成懸濁液培養物又はプロトプラストを得ることが実質的に不可能であることを特徴とする前記植物。

10. 特定系統の植物であって、特に該系統の未形質転換プロトプラスト10000当たり約500以下、特に約100以下、特定的には約10以下、より特定的には約1以下しか正常表現型植物を再生できない場合に、前記培養条件下では該系統の形質転換胚形成懸濁液培養物又は形質転換プロトプラストから該系統の正常表現型雄性植物のような正常表現型植物として植物を再生することが実質的に不可能であることを特徴とする請求項9に記載の植物。

11. 請求項1から8のいずれか一項に記載の方法により作出される形質転換植物、特に単子葉植物、特定的にはイネ科植物、より特定的にはトウモロコシ又はイネのような穀類。

12. タイプIカルスを形成する能力を有するが、Gordon-Kammら(1990) The Plant Cell 2:603及びFrommら(1990) Bio/Technology 8:833により記載されている培養条件下では、10%以上、特に1%以上、特定

的には0.1%以上、より特定のには0.01%以上の頻度でのタイプ11カルスを形成する能力をもたないことを特徴とする請求項9から11のいずれか一項に記載のトウモロコシ植物。

13. 前記DNAで組込み的に形質転換された請求項9から12のいずれか一項に記載の植物の細胞又は複数の該細胞から本質的に構成される培養物。

14. 請求項9から12のいずれか一項に記載の形質転換植物の種子。

15. ハイブリッド植物の作出手段のような授粉植物であることを特徴とする請求項9から12のいずれか一項に記載の植物。

16. 請求項15に記載の授粉植物と別の近交系植物とを交配することにより得られるハイブリッド。

17. タンパク質が発現される植物細胞を死滅又は不能にすることが可能な該タンパク質をコードし且つタベート特異的PTA29プロモーターの制御下にあるコーディング配列で形質転換された雄性不稔性単子葉植物、好ましくはイネ科植物、特にトウモロコシ植物、特定のには請求項12に記載のトウモロコシ植物、又は雄性不稔性植物の種子。

明 細 書

単子葉植物の形質転換方法

本発明は、単子葉植物全般、特にイネ科植物、特定のにはトウモロコシ及び他の主要穀類の迅速且つ効率的な形質転換方法に係る。本発明は特に、トランスジェニック単子葉植物を得るための、緻密な胚形成カルスを形成することが可能な無傷組織又はこのような組織から得られる緻密な胚形成カルスの使用に係る。

本発明は更に、本発明の形質転換方法により得られる新規トランスジェニックイネ科植物、特に穀類に係る。

発明の背景

近年、植物の遺伝子操作の可能性はめざましく拡大している。多数のトランスジェニック双子葉植物種が得られた。しかしながら、多くの植物種、特に単子葉類、特定のにはトウモロコシ、コムギ及びイネのような経済的に重要な種を含むイネ科に属する植物は、安定的な遺伝子形質転換が非常に困難であるとされている。

問題は、a) 単子葉植物細胞をDNAで組込み的に形質転換(即ち単子葉植物細胞の核ゲノムにDNAを安定的に挿入)する点、及びb) 正常表現型雄性成体単子葉植物のような正常表現型単子葉植物を形質転換細胞からの再生す

18. 請求項17に記載の形質転換単子葉植物の細胞又は複数の該細胞から本質的に構成される培養物。

る点の両方にある。このような問題は主に1) DNA取り込み、2) 取り込まれたDNAによる組込み的形質転換及び3) 形質転換細胞から正常表現型単子葉植物を再生するという点に関してコンピテントな単子葉細胞が得られないことに起因すると示されている(Potrykus (1990) Bio/Technology 9:535)。一般に、(ポリエチレングリコール処理及び/又はエレクトロポレーションを使用して)プロトプラストに遺伝子を直接移入すると、成功の可能性が最も高いと考えられている。このような直接遺伝子移入方法で使用されるプロトプラストは、ほとんどの場合は胚形成細胞懸濁液培養物から得られる(Lazzeri及びLörrz (1988) Advances in Cell Culture, Vol. 6, Academic press, p. 291; Ozias-Akins及びLörrz (1984) Trends in Biotechnology 2:119)。しかしながら、ほとんどの遺伝子型ではプロトプラストから正常表現型植物を再生し難いという事実により、このような方法の成功は制限されている。

最近になって特定の系統のイネ(Shimomotoら

(1989) Nature 338:274; Dat
 taら (1990) Bio/Technology
 8:736; 及びHayashimotoら (199
 0) Plant Physiol. 93:857) 及
 ビトウモロコシ(Gordon-Kammら (1990)
 Bio/Technology 2:603; Pro
 mmら (1990) Bio/Technology
 8:833; Gouldら (1991) Plant
 Physiology 95:426; 並びにPCT
 公開特許WO91/02071及びWO89/1210
 2)を形質転換し、これらの系統から正常表現型植物を再
 生するのに成功したことが報告された。しかしながら、こ
 れらの形質転換及び再生方法を単子葉類全般、特にイネ科
 植物、より特定のには穀類に適用できるかどうかはこのよ
 うな報告からは明らかでない。

発明の要約

本発明は単子葉植物、特に主要穀類(例えばトウモロコ
 シ、コムギ、イネ、ライムギ等)のようなイネ科植物のゲ
 ノムを効率的且つ再現可能に形質転換するための新規方法
 を提供する。この方法は、a) 緻密な胚形成カルスを形成

グメント)、好ましくは線状DNAフラグメントで形質転
 換することができる。好ましくは、DNAフラグメントの
 少なくとも1個は、形質転換植物細胞の選択可能又はスグ
 リン可能なマーカー、好ましくは選択可能なマーカーと
 して機能し得る遺伝子を含む。このようなマーカーDNA
 フラグメントは別の着目遺伝子と同一のDNAフラグメン
 ト又は別のDNAフラグメント上に配置され得る。

形質転換細胞は、従来通りに選択的増殖地で好ましくは長
 時間培養することにより非形質転換細胞から分離すること
 ができ、こうして選択された形質転換細胞は、そのゲノム、
 特に核ゲノムに安定的に組み込まれた着目遺伝子を有する
 正常表現型植物(例えば成熟植物)に従来通りに再生され
 得る。

本発明は更に、1個以上のDNAフラグメントで安定的
 に形質転換されたゲノムを有する単子葉植物、特にイネ科
 植物、特に穀類植物の新規コンピテント細胞; このような
 形質転換細胞から構成される細胞培養物; このような形質
 転換細胞から再生された正常表現型植物(例えば正常表現
 型稈性植物); 及びこのような形質転換植物の種子を提供
 する。このような形質転換細胞、細胞培養物、植物及び種

することが可能な単子葉植物の無傷組織又はb)このよう
 な無傷組織から得られる緻密な胚形成カルス、特にその胚
 形成セクターのいずれか一方の細胞をDNAで形質転換す
 ることからなり、このような細胞は1)DNAの取り込み、
 2)DNAによる植物ゲノム、好ましくはその核ゲノムの
 組込み的形質転換及び3)これらのゲノムの形質転換後に
 細胞から正常表現型植物(例えば正常表現型稈性成体植物)
 を再生する点に関してコンピテントである。このようなコ
 ンピテント細胞は好ましくは植物の無傷組織又は緻密な胚
 形成カルスを損傷及び/又は分解することにより得られ、
 例えばa)無傷組織及びその細胞又はこのような無傷組織
 から得られる緻密な胚形成カルス及びその細胞を切断し、
 及び/又はb)無傷組織又は緻密な胚形成カルスの性質に
 依存して、無傷組織又は緻密な胚形成カルスを酵素で処理
 し、無傷組織又は緻密な胚形成カルスの細胞壁を分解する
 ことにより得られる。

こうして損傷及び/又は分解され、本発明のコンピテン
 ト細胞を含む無傷組織又は緻密な胚形成カルスは、好まし
 くはエレクトロポレーションのような直接遺伝子移入によ
 り1個以上のDNAフラグメント(例えば外来DNAフラ

グメント)として、タンパク質が発現される植物細胞を死滅又は
 不能にすることが可能なタンパク質をコードし且つターゲ
 ット特異的PTA29プロモーターの制御下にあり、従って
 植物を遺伝性不稔性にする遺伝子を含むDNAフラグメント
 で形質転換されたこのような形質転換細胞、細胞培養物、
 植物及び種子を挙げることができる。本発明の形質転換イ
 ネ科植物、特に形質転換トウモロコシ及びイネは、特にこ
 のような植物系統の未形質転換プロトプラスト10000
 あたり、約500以下、特に約100以下、特定のには約
 10以下、より特定のには約1以下しか正常表現型植物を
 再生することができない場合、正常表現型植物のような形
 質転換植物を再生させることが従来技術では事実上不可能
 であるような植物系統、形質転換胚形成懸液培養物又は
 形質転換プロトプラストに由来することを特徴とする。

図面の簡単な説明

図1: 未成熟接合体胚のエレクトロポレーションにより得
 られる5個のトウモロコシ形質転換株の実験例2のNp1
 I1ゲルアッセイ。

図2: 配列番号2に示す配列をプローブとして使用した実
 験例1のトウモロコシ形質転換株(H99-M148-1)

の1種のゲノムDNAの実施例2のサザンプロット。標準フラグメントの長さを表示する。起点は0により表示する。

レーン 1: スファージのPst I 消化DNA + Hind I I I 消化pTTM1 (陽性対照-プローブは2824bp pTTM1フラグメントにハイブリダイズする)
 2: Bgl I I I 消化ゲノムDNA
 3: EcoR I 消化ゲノムDNA
 4: EcoR V 消化ゲノムDNA
 5: Hind I I I 消化ゲノムDNA
 6: BamH I 消化ゲノムDNA
 7: Pvu I 消化ゲノムDNA
 8: Pvu I I 消化ゲノムDNA
 9: Pst I 消化ゲノムDNA
 10: 未形質転換H99植物のEcoR I 消化植物ゲノムDNA (陰性対照)

図3: 未成熟接合体胚に由来する緻密な胚形成カルスフラグメントの電気泳動により得られた7種の形質転換株の実施例4のNpt I I I ゲルアッセイ。

図4: 配列番号2に示す配列をプローブとして使用した英

施例3のトウモロコシ形質転換株(Pa91-M146-2)の1種のゲノムDNAの実施例4のサザンプロット。標準フラグメントの長さを表示する。起点は0により表示する。

レーン 1: スファージのPst I 消化DNA + Hind I I I 消化pTTM1 (陽性対照-プローブは2824bp pTTM1フラグメントにハイブリダイズする)
 2: Bgl I I I 消化ゲノムDNA
 3: EcoR I 消化ゲノムDNA
 4: EcoR V 消化ゲノムDNA
 5: Hind I I I 消化ゲノムDNA
 6: BamH I 消化ゲノムDNA
 7: Pvu I 消化ゲノムDNA
 8: Pvu I I 消化ゲノムDNA
 9: Pst I 消化ゲノムDNA
 10: EcoR I 消化植物ゲノムDNA (陰性対照)

配列表

配列番号1: pDE108の配列。

配列番号2: サザンハイブリダイゼーションでキメラne遺伝子を検出するために使用されるプローブの配列。

配列番号3: プラスミドpVE107及びpVE108の構築に使用され且つタバコのTA29遺伝子からのプロモーター及びバルナーゼ(barnase)遺伝子を含むプラスミドpTTM8のDNAフラグメントの配列。

配列番号4: pDE110の配列。

発明の詳細な説明

単子葉類において、胚形成カルスは2種の異なる周知の型をとり得る(Vasil (1988) Bio/Technology 6:397; Armstrong及びGreen (1988) Crop Sci. 28:363)。胚形成カルスの一方の型は、緻密及び/又は結晶状と説明すると最適であり、しばしば有機化しているとみなされ得る。本明細書中で「緻密な胚形成カルス」と呼称するこのようなカルスは本発明に従って使用される。他方の一般により発生頻度の低い胚形成カルスの型は、軟弱で砕けやすく、胚形成能が高いと説明すると最適であり、本明細書中で「砕けやすい胚形成カルス」と呼称するこのようなカルスは、一般に緻密な胚形成カルスよりも迅速に

増殖する。どちらの型のカルスからも正常表現型植物を再生することができ、どちらの型のカルスでも種々の発生段階に体細胞胚が存在する。2種のカルスの外観及び最終形態は種々の単子葉種、特に種々の穀類種で異なり得る。しかしながら、2種のカルスは種々の単子葉種の組織培養物を形成及び操作する当業者により容易に区別することができる。

トウモロコシにおいて、緻密な胚形成カルス及び砕けやすい胚形成カルスは夫々タイプIカルス及びタイプIIカルスとしてのほうがよく知られている。タイプI及びタイプIIトウモロコシカルスの構造及び特性の種々の顕著な特徴は、Armstrong及びPhillips (1988) Crop Sci. 28:363; Springerら(1979) Protoplasma 101:269; Franz (1988) "Cytodifferentiation during callus initiation and somatic embryogenesis in Zea mays L.", Ph.D. Thesis, University of Wageningen, The Ne

therlands; Ozias-Akinsら (1982) *Protoplasma* 110:95; Novakら (1983) *Maydica* 28:381; Horら (1983) *Protoplasma* 118:169; Greenら (1975) *Crop Sci.* 15:417; Freelingら (1976) *Maydica* 21:97; Luら (1982) *Theor. Appl. Genet.* 62:109; Vasilら (1985) *Protoplasma* 127:1; Dunstanら (1978) *Protoplasma* 97:251; Vasilら (1982) *Bot. Gaz.* 143:454; Green (1983) *In: Basic biology of new developments in biotechnology*, Hollaenderら編, Plenum Press, New York, pp.195-209; Vasilら (1984) *Am. J. Bot.* 71:158; 及び Kamoら (1985) *Bot. Gaz.* 146:327 のような文献に記載されている。

yozukaら (1988) *Theor. Appl. Genet.* 76:887)、コムギ (Redwayら (1990) *Theor. Appl. Genet.* 76:609; Redwayら (1990) *Plant Cell Reports* 8:714) 及びオオムギのような穀類種の緻密な胚形成カルスと砕けやすい胚形成カルスとを区別することができる。

単子葉植物全般からでは、本発明の緻密な胚形成カルスは未成熟接合体胚、成熟種子、葉基部、葯、小胞子、幼花序等のような外植片の *in vitro* 培養により得られる。トウモロコシにおいてタイプIカルスは未成熟接合体胚から最も効率的に発生する。緻密な胚形成カルスは適切な外植片から誘導され得、十分に確立された方法に従って培地に維持される (Hodgesら (1986) *Bio/Technology* 4:219)。カルス培養物の保存中には胚形成細胞を含むカルスの胚形成セクターのみを選択及びサブ培養するように注意すべきである。このような細胞は一般に小型で緊密に充填され、壁が薄く、細胞質が豊富であり、多数の小さい気孔、脂質液滴及び澱粉粒子を含む高好塩基性細胞として特徴付けることができる (V

タイプIトウモロコシカルスはほぼ白色、青みがかった白色又は黄色がかった緻密な外観を呈しており、多くの場合は結節状表面を有しており、その結節状外観に示されるように組織の有機化集合体として発生及び増殖する。該カルスは細胞会合及び分化の程度が高いことと、根、葉構造及び維管束要素のような種々の構造とにより特徴付けられる。体細胞胚が一般に認識され得る。再生された苗条の起源は必ずしも明白ではなく、外見からは体細胞胚形成及び器官形成の両方により形成されるように見える。体細胞胚発生中に胚様体は融合して堅く白色のカルスを生じるか、又は二次体細胞胚に生長し得る。

タイプIIトウモロコシカルスは主に軟弱で砕けやすく、白色又は青みがかった黄色の多少透明な外観を有しており、胚形成能が高い。該カルスは迅速に増殖し、維管束要素を含まない。タイプIIカルスは、胚様体をカルスに付着させる胚柄様構造を有し得る多数の平滑で球状の胚様体を含むという点が砕けやすい非胚形成カルスと異なる。胚様体は十分に有機化された体細胞胚にも生長し得る。

2種のトウモロコシカルスタイプに見いだされるほぼ同一の顕著な特徴を使用して、他の単子葉類、特にイネ (K

asil (1988) 前出)、緻密な胚形成カルスを形成することが可能であるとして知られている組織を植物から取り出す最も簡便な方法は切解である。

本発明のコンピテント細胞は、注意な胚形成カルスを形成することが可能な無傷組織を植物から従来方法で切断することにより単子葉植物から直接得られる。このように損傷させた無傷組織の細胞はその後、安定的に形質転換することができる。しかしながら、このような損傷完全細胞をより小さいフラグメントに細分し、このような組織を更に損傷させ、形質転換のためのよりコンピテントな細胞を提供すると好適である。組織フラグメントの平均寸法は好ましくは長さ0.1~5mm、特に長さ1~2.5mm、より好ましくは長さ1.25~1.75mmである。この点で本発明の損傷無傷組織は、植物から切断された任意の組織片又は任意のそのフラグメント (例えば切断片) であり得る。即ち、「無傷組織」なる用語は組織培養段階を挟まずに天然に存在する植物部分から得られる単子葉植物細胞の集合体を意味するものと理解すべきである。

本発明のコンピテント細胞を生成するためには、植物から無傷組織を切断し、場合により更に破壊又は損傷させる

Cell Culture, A Practical Approach", R. A. Dixon 編, 第3章に記載されているような種々の酵素又は酵素溶液を使用することができる。

植物から得られる無傷組織が小さすぎて損傷(例えば切断)できない場合又は損傷させた無傷組織が小さすぎてそれ以上損傷(例えばより小片に細分)できない場合には、酵素処理を使用して付加的なコンピテント細胞を生成することができる。このような酵素処理は特に胚、特に生長中の種子から単離された未成熟接合体胚及び例えばトウモロコシの成熟(例えば乾燥)種子から単離された成熟接合体胚で本発明のコンピテント細胞を形成するために特に有用であり得る。胚は一般に種子から取り出すために切断されず、一般に緻密な胚形成カルスを生成する能力を損なわずに著しく小さいフラグメントに細分することはできない。未成熟胚は緻密な胚形成カルスの唯一の適切且つ信頼できるソースであるので、トウモロコシでは特に重要である。イネ及び他の単子葉類では成熟胚を使用することもできる。これに関連して、トウモロコシのような植物の場合、無傷組織(例えば未成熟トウモロコシ胚)は約0.5~2mm、

ように切断することにより無傷組織及びその個体細胞を機械的に破壊又は損傷させれば一般に十分である。この点で「機械的破壊」及び「損傷」なる用語は、細胞を暴露し、本発明に従ってDNAフラグメントを挿入するために、無傷組織の1個以上の細胞の細胞壁を著しく損傷させることを意味する。従って、本発明による「機械的破壊」又は「損傷」は細胞壁の切断に制限されず、細胞壁をこすったり、押し潰したり、又はたたくなどの方法で細胞壁の1部分以上を物理的に除去するか又は細胞壁を1カ所以上不連続にする他の方法も包含する。

しかしながら、本発明に従って無傷組織を機械的に破壊又は損傷する操作に加えて又はこの操作の代わりに、特に無傷組織が比較的大きい場合には無傷組織を酵素又は酵素混合物で処理して植物細胞壁を分解してもよい。酵素処理は従来通りに実施することができる。好ましくは、酵素を無傷組織に加えてまず最初に細胞壁に穴をあける。従って、酵素処理は組織を完全に破壊しないように比較的短時間(例えば無傷組織の性質及びコンシステンシーに依存して1~10分間)行うと好適である。植物の種類に応じて Powell 及び Chapman (1985) "Plant

好ましくは0.5~1.5mmの最大長を有することが好ましいが、もっと短い0.5~1mmの長さも使用できる。

本発明によると、無傷組織を好ましくは例えば約15分間以上、好ましくは約30分間~約5時間、特に2~3時間予備原形質分離にかけ、後述するエレクトロポレーション用緩衝液のような従来の高張液中に組織を置く。この予備原形質分離処理の目的は、無傷組織の細胞中でそのプロトプラスト、好ましくはその細胞膜の全部又は少なくとも一部をその細胞壁から分離することである。このような予備原形質分離は好ましくは無傷組織の損傷後で無傷組織の酵素処理前に実施される。無傷組織が既に酵素処理により分解されている場合には、その後の予備原形質分離を短時間だけ行い、上述のようにトウモロコシの未成熟胚の酵素処理後、このような原形質分離を全く行わないことが好適である。

本発明のコンピテント細胞は、本発明の無傷組織を *in vitro* 消費して、緻密な胚形成カルスを生成し、次にカルスをより小さいフラグメントに細分することによって得られる。得られるカルスフラグメントは、カルスの胚形成セクター又は部分を完全又は少なくとも部分的に含

むべきである。カルスフラグメントは更に好ましくは、0.5~2.5mm、特に1~2mm、より特定のには1.25~1.75mmの平均最大長を有しており、好ましくは約0.1mmの最小長を有する。十分な量の緻密な胚形成カルスを得るためには、組織外植片から得られるような一次カルスを少なくとも1カ月間増殖させ、このような一次カルスの胚形成セクターをこの期間に少なくとも1回サブ培養すると好適である。本発明のコンピテント細胞を生成するためには、緻密な胚形成カルスの胚形成セクター及びその細胞を例えば切断により機械的に破壊又は損傷させれば十分であると考えられる。しかしながら、カルスを機械的に破壊する操作に加えて又はこの操作の代わりに、特に緻密な胚形成カルスフラグメントがまだ比較的大きい場合にはカルス細胞壁を酵素処理してカルス細胞壁を分解してもよい。この酵素処理は従来通りに実施することができる。酵素処理は好ましくはまず最初にカルスフラグメントの細胞の細胞壁に穴をあけるように実施され、従って、酵素処理は組織を完全に破壊しないように比較的短時間(例えばカルスフラグメントの性質及びコンシステンシーに依存して1~10分間)行うと好適である。単子葉植物に依存し

て Powell 及び Chapman (1985) 前出に記載されているような種々の酵素又は酵素溶液を使用することができる。好ましくは、緻密な胚形成カルスフラグメントを同様に上述のように一定時間(例えば2〜3時間)原形質分離する。

次に本発明のコンピテント単子葉植物細胞を形質転換させるために、上述のように得られた損傷及び／又は分解した無傷組織又は緻密な胚形成カルスフラグメント、特にその胚形成セクターを、着目遺伝子を含む1個以上のDNAフラグメントと接触させる。着目遺伝子の少なくとも1個が形質転換単子葉植物細胞中で選択可能なマーカーとして機能するように構成すると好適である。直接遺伝子移入、特にエレクトロポレーションは最適な形質転換効率を提供すると考えられる。しかしながら、ポリエチレングリコール、DNAで被覆した微小発射体の撃ち込み(即ち例えば粒子銃を使用するバイオリストック(biolistic))な形質転換及びAgrobacteriumで媒介される形質転換を使用する直接遺伝子移入のような他の既知のDNA移入技術を使用してもよい。

本発明の植物形質転換方法を実施する際に使用される緻

密な胚形成カルスは、砕けやすい胚形成カルスのいくつかの特徴を有する。この点で緻密な胚形成カルス又は砕けやすい胚形成カルスは緻密な胚形成カルスのいくつかの特徴と砕けやすい胚形成カルスのいくつかの特徴とを有する型のカルスに変異すること又は変異させることができる。その結果、このような中間型のカルス及びその胚形成部分は本発明に従って形質転換され得る。要するに中間型のカルス及び砕けやすい胚形成カルスで発生する体細胞胚は上述のように単離し、損傷及び／又は分解した後、形質転換することができる。即ち、本発明の方法を実施するにあたり、中間型カルス又は砕けやすい胚形成カルスから得られるこのような体細胞胚は、特に体細胞胚の細胞を形質転換するための手段としてエレクトロポレーションを使用する場合、生長中又は成熟した種子から得られる未成熟又は成熟接合体胚と等価であるとみなすことができる。

本発明によると、エレクトロポレーションは従来通りに実施され得る。この点で損傷及び／又は分解した無傷組織又はカルスフラグメント、特にその分葉又は胚形成セクション、より特定のにはその胚形成セクションを(例えばDekeyserら(1990) The Plant Ce

11 2:591に記載されているように)エレクトロポレーション装置で使用するのに適したキューベットに移すことができる。好ましくは、エレクトロポレーション緩衝液200μl当たり約10〜500mg、特に約50〜200mg、最適には約100〜150mgの無傷組織又はカルスフラグメントをキューベットに移す。トウモロコシのような穀類の場合(特に酵素処理した未成熟無傷胚を使用するのが好適な場合)には、エレクトロポレーション緩衝液200μl中に約10〜500個、特に約50〜150個、より特定のには約75〜125個の胚をキューベットに移すことが好ましい。次にDNAをキューベットに加え、エレクトロポレーションを行う。好ましくは、エレクトロポレーションの前にDNAを無傷組織又はカルスフラグメントと共に(例えば約1時間)コインキューベートすると好適である。円形よりもむしろ線状で比較的小寸法、好ましくは約20kb未満、特に15kb未満、特定のには10kb未満、より特定のには6kb未満(例えば約2〜3kbまで)のDNAで最良の結果が得られると考えられる。この点で、本発明のコンピテント細胞を複数の着目遺伝子で形質転換するために異なる組成の複数の線状DNAフラグメントを

使用することができる。好ましくは、無傷組織又はカルスフラグメントを含むキューベットに約5〜30μg、特に約10〜25μg、より特定のには約20μgのDNAを加える。特定のエレクトロポレーション条件に限定する必要はなく、例えば150mM NaCl又は80mM KClを含有するエレクトロポレーション緩衝液を使用して900μFキャパシタから375V/cmの電界強度でパルス放電することにより良好な結果が得られる(Dekeyserら(1990)前出)。

(例えばエレクトロポレーションにより)形質転換が完了したら、形質転換した単子葉細胞を含む無傷組織又はカルスフラグメントを適切な培養培地、好ましくは選択培地(形質転換細胞が選択可能なマーカーを含む場合)に移す。この転移は形質転換後できるだけ早く、好ましくは形質転換直後、特に形質転換後1〜3日間以内に実施すべきである。好ましくは、選択可能なマーカーで形質転換された無傷組織又はカルスフラグメントを、従来の培養条件及び選択剤を補充した培養培地(例えばVasil(1988)前出の引用文献参照)を使用して培養する。選択剤の選択は、以下に記載するように無傷組織の細胞又はカルスフラ

グメントを形質転換するためにDNAフラグメント中で使用される選択可能なマーカーに依存する。選択剤の濃度は、選択可能なマーカーを含有するDNAフラグメントを細胞のゲノムに好ましくは完全に組み込んだ安定的形質転換株のみが生存し、単離できるように、形質転換細胞に非常に高い選択的圧力を提供するように設定すべきである。このような形質転換無傷組織又はカルスフラグメントを非選択培地で数日間培養することもできるが、選択培地にできるだけ早く移し、正常表現型植物を再生するために使用可能な形質転換した緻密な胚形成カルスのような形質転換形態形成カルスを十分に差生成するように長期間（例えば6カ月間）、好ましくは少なくとも1カ月、特に2〜3カ月間維持することが好ましい。更に、培地の高張性は例えば培地にマンニトールを補充することにより短期間（例えば2〜3週間まで）維持すると好適である。

本発明によると、単子葉植物のゲノム、特に核ゲノムに任意のDNAフラグメントを組み込むことができる。一般に、DNAフラグメントは形質転換植物細胞において機能的であり且つこのような細胞及び細胞から再生される植物に付加的な特性を与える外来もしくは内在遺伝子又は他の

DNA配列を含む。このために、DNAフラグメントは好ましくは次の作動的に連係するDNA配列：1）植物細胞中でコーディング配列を発現させることが可能なプロモーター配列（「プロモーター」）、2）植物細胞内で特異的な活性を有するタンパク質（「着目タンパク質」）をコードする配列（「コーディング配列」）、及び3）適切な3'転写調節シグナルを含む1個以上のキメラ遺伝子を含む。タンパク質の必要な機能を得るためには、シトソール、ミトコンドリア、クロロプラスト又は小胞体のような植物細胞の1個以上の特定の区画にタンパク質を標的することも必要であり得る。シトソールに標的するためには、上述のようなキメラ遺伝子をそのまま使用することができる。一方、他の区画に標的するためには、キメラ遺伝子のDNAフラグメント1）及び2）の間に付加的な配列（「標的配列」）が存在することが必要である。必要に応じてキメラ遺伝子は更に転写及び/又は翻訳エンハンサーを含んでもよく、DNA配列のコドン使用を植物細胞における発現のために最適化することができる。

本発明のキメラ遺伝子は十分に確立された原理及び方法に従って構築することができる。この点では、種々のDN

A配列はタンパク質のコーディング配列（又は標的配列が存在する場合には標的配列）の開始コドンで翻訳が開始するように連係すべきである。

形質転換双子葉植物で遺伝子を発現させるために現在使用されている器官及び組織特異的な種々の構成プロモーターは本発明の形質転換単子葉類で使用するためにも適切であると考えられる。この点では着目タンパク質をコードするコーディング配列と、その上流（即ち5'）でコーディング配列の発現に適切な外来又は内在プロモーターとを含むキメラ遺伝子で特定の植物細胞を形質転換させることができる。適切な外来構成プロモーターは、異種遺伝子を構成的に発現させる（Ode11ら（1983）*Nature* 313:810）カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）単離株CM1841（Gardnerら（1981）*Nucl. Acids. Res.* 9:2871）及びCabbB-S（Frankら（1980）*Cell*, 21:285）（「35Sプロモーター」）；CaMV単離株CabbB-JI（Hu11及びHowe11（1978）*Virology* 86:482）から単離することができ且つその配列（35Sプロモ-

ーターの配列はヨーロッパ特許公開明細書（EP）第359617号に開示されている）及びトランスジェニック植物における高活性（Harpsterら（1988）*Mol. Gen. Genet.* 212:182）において35S3プロモーターと異なる関連プロモーター（「35S3プロモーター」）；並びに*Agrobacterium*（Veltenら（1984）*EMBO J.* 3:2723）のT-DNAの夫々1'及び2'遺伝子が発現させ且つ損傷誘導プロモーターであるTR1'及びTR2'プロモーターを含む。器官特異的、組織特異的及び/又は誘導可能な適切な外来プロモーターも知られており（例えばKuhlemelerら（1987）*Ann. Rev. Plant Physiol.* 38:221の引用文献参照）、例えば光合成組織中のみで活性な光誘導プロモーター（Krebbersら（1988）*Plant Mol. Biol.* 11:745）である*Arabidopsis thaliana*の1.5-リブ羅斯ニリン酸カルボキシラーゼの小サブユニット遺伝子（例えば1A遺伝子）のプロモーター（「ssu」プロモーター）；ヨーロッパ特許第344029号に開示されている薬特

異のアロモーター； 並びに例えば *Arabidopsis thaliana* の種子特異的プロモーター (Krebbersら (1988) *Plant Physiol.* 87:859) を挙げることができる。ヨーロッパ特許第344029号に記載されているように単子葉類を雄性不稔性にするように形質転換するために特に有用なプロモーターは、タベート特異的プロモーターPTA29、PTA26及びPTA13、特にヨーロッパ特許第344029号のPTA29である。

同様に、形質転換した双子葉植物で使用される既知の3'転写調節配列及びポリアデニル化シグナルも本発明の形質転換単子葉類で使用できると考えられる。このような3'転写調節シグナルはコーディング配列の下流(即ち3')に提供され得る。この点では、キメラ遺伝子の発現を得るために適切な外来又は内在転写終結及びポリアデニル化シグナルのいずれかを含むキメラ遺伝子で特定の植物細胞を形質転換することができる。例えば、遺伝子7 (Velten及びSchell (1985) *Nucl. Acids Res.* 13:6998)、オクトピンシンターゼ遺伝子 (Gielensら (1983) *EMBO J.*

3:835) 及び *Agrobacterium tumefaciens* TiプラスミドのT-DNA領域のノバリンシンターゼ遺伝子のような遺伝子の外来3'末端を使用することができる。

形質転換した植物細胞中、好ましくはその細胞質中で発現可能なキメラ遺伝子を構築し、その後、その着目タンパク質を細胞のミトコンドリア、クロロプラスト及び/又は小胞体の内腔に転位させるために、適切な標的配列が知られている。このような標的配列の選択は限定的ではなく、遺伝子の発現産物を転位させる標的ペプチドをコードする外来又は内在標的配列を含むキメラ遺伝子で特定の植物細胞を形質転換することができる。「標的ペプチド」なる用語は、一般に真核細胞内でクロロプラストタンパク質、ミトコンドリアタンパク質、タンパク質のサブユニット、又は小胞体に転位したタンパク質と金合しており且つ細胞の核DNAによりコードされる前駆物質タンパク質の一部として細胞中で産生されるポリペプチドフラグメントを意味する。標的ペプチドは核コードされたクロロプラストタンパク質、ミトコンドリアタンパク質又はサブユニットがクロロプラスト、ミトコンドリア又は小胞体の内腔に転位す

る過程に関与する。転位過程に標的ペプチドはタンパク質又はサブユニットから分離又はタンパク質分解により除去される。ヨーロッパ特許出願(EPA)第8540259.2号及び8840222.9号に記載されているように発現された着目タンパク質を形質転換植物細胞内で転位させ得る標的ペプチドを発現させるためには、キメラ遺伝子に標的配列を配置すればよい。クロロプラストに輸送するために適切な標的ペプチドは、酵素1、5-リブ्रोースニリン酸カルボキシラーゼの小サブユニットのトランジットペプチド (Krebbersら (1988) *Plant Mol. Biol.* 11:745; EPA 8540259.6, 2) であるが、Watson (1984) *Nucl. Acids Res.* 12:5145及びVon Heijneら (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:104に記載されているような他のクロロプラストトランジットペプチドも使用できる。適切なミトコンドリア標的ペプチドはSchatz (1987) *Eur. J. Biochem.* 165:1及びWatson (1984) 前出に記載されているようなミトコンドリアトランジットペプチドである。着目タ

ンパク質を植物細胞の小胞体の内腔に転位させ得る適切な標的ペプチドは、例えばVon Heijne (1988) *Biochem. Biophys. Acta* 947:307及びWatson (1984) 前出に記載されているようなシグナルペプチドである。

トランスジェニック双子葉植物の作出に使用可能なコーディング配列は周知であり(例えばWeisingら (1988) *Annual Rev. Genet.* 22:421に記載されているコーディング配列を参照のこと)。このようなコーディング配列は本発明の形質転換単子葉植物で同様に良好に使用できると考えられる。この点ではコーディング配列は植物に対して外来でも内在的でもよく、例えば昆虫種に対して毒性であり、従って植物を昆虫の攻撃から保護し(EP193259, EP305275及びEP358556); 植物をストレス条件から保護し(EP359617); 特定の除草剤に対する耐性を植物に与え(EP242236); コーディング配列が雄性又は雌性器官特異的プロモーターの制御下にあるときに、タンパク質が植物を夫々雄性雄性(EP344029)又は雌性雌性(EP412006)にできるようにタンパク質

が発現される植物細胞を死滅又は不能にし；植物又は選択された植物器官から抽出することができ、場合により経済的に重要なペプチド又はタンパク質源として使用できるように更に処理することができ（EP 3 193 53）；又はタンパク質が発現される形質転換植物又はその器官を高栄養レベルの食品として動物又はヒトに使用できるように栄養的に重要なアミノ酸が豊富であるタンパク質を例えばコードすることができる。

単子葉類を昆虫耐性にするように形質転換するために特に有用なコーディング配列は、殺虫性結晶タンパク質及びその殺虫性ポリペプチド毒素をコードする Bacillus thuringiensis (Bt) 株及びその断頭部分から単離した遺伝子である（参考のために Häfte 及び Whiteley (1989) Microbiol. Rev. 53:242 を参照）。殺虫性結晶タンパク質（例えばトウモロコシ、イネ、コムギ及びオオムギ）における昆虫駆除に特に重要であると考えられる Bt 遺伝子としては、Helicoverpa 種（例えば H. zea 及び H. armigera）の駆除用として Cry I Ab 遺伝子（EP 1 932 59）及び Cry I Ac 遺伝子；トウモロコシにお

ける Ostrinia 種（例えば O. nubilalis）

の駆除用として Cry I Ab 遺伝子及び Cry I b 遺伝子（EP 3 585 57）；トウモロコシ及びコムギにおける Agrotis 種の駆除用として Cry I Ac 遺伝子；

及びトウモロコシにおける Spodoptera 種（例えば S. frugiperda）の駆除用として Cry I D 及び Cry I E 遺伝子（EP 3 585 57）などの遺伝子が挙げられる。トランスジェニック植物の組織でこのような遺伝子を十分に発現させるためには、PCT 出願 PCT/EP 91/00733（PCT 公開 WO 91/16432）に記載されているように遺伝子を修飾すると好適である。

本発明の選択可能なマーカーはキメラ遺伝子であり、該遺伝子のコーディング配列は、該遺伝子が発現される植物細胞に抗生物質及び／又は除草剤のような選択剤に対する耐性を与えるタンパク質をコードする。本発明のスクリーン可能なマーカーはキメラ遺伝子であり、該遺伝子のコーディング配列は、該遺伝子が発現される植物細胞に異なる色のような異なる外観を与えるタンパク質をコードし、こうしてスクリーン可能なマーカーで形質転換された植物を

手動的に分離できるようにする。本発明に従って単子葉植物を形質転換するための選択可能なスクリーン可能なマーカー、好ましくは選択可能なマーカーの選択は非限定的であり、従来の選択可能なマーカー及びスクリーン可能なマーカー（例えば Welislingら（1988）前出に記載されているようなマーカー）を使用することができる。選択可能なマーカーの適切なコーディング配列の例は、抗生物質カナマイシンに対する耐性を与える酵素ネオマイシンホスホトランスフェラーゼをコードする neo 遺伝子（Beckら（1982）Gene 19:327）；抗生物質ハイグロマイシンに対する耐性を与える酵素ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼをコードする hyg 遺伝子（Grittz 及び Davies（1983）Gene 25:179）；及び除草剤ホスフィノトリシン（phosphinothricin）に対する耐性を与えるホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼをコードする bar 遺伝子（EP 2 422 36）である。クロロプラスト代謝に作用する除草剤又は他の選択剤に対する耐性を与えるタンパク質をコードする選択可能なマーカー遺伝子（例えば bar 遺伝子）を使用する場合には、

マーカー遺伝子は上記のようなクロロプラスト膜の配列を有するキメラ構造の一部であると好適である。スクリーン可能なマーカーの適切なコーディング配列の例は、 β -グルクロニダーゼをコードする gus 遺伝子（Jeffersonら（1986）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 6:3901）及びルシフェラーゼ遺伝子（Owら（1986）Science 234:856）である。

上述のように、選択剤の存在により提供される選択圧力は、選択可能なマーカーを含む本発明の形質転換植物細胞の培養中にかなり高いことが好ましい。例えば、neo 遺伝子を選択可能なマーカーとして使用する場合には、カナマイシンを培地中に少なくとも約 100～200 mg/l、好ましくは少なくとも約 200 mg/l の濃度で使用すべきである。このような高い選択圧力は更に長期間（例えば 2～4 か月）維持すべきである。しかしながら、特定の選択圧力及び期間に限定する必要はなく、選択圧力及びその期間は従来通りに選択できると考えられる。一方、bar 遺伝子を選択可能なマーカー遺伝子として使用する場合には、ホスフィノトリシン（PPT）を培地中に 0.5～50、

特に2〜20mg/lの濃度で使用すると好ましい。

本発明の緻密な胚形成カルの損傷及び／又は分解した無傷組織又は損傷及び／又は分解した胚形成セクターの形質転換細胞の培養で産生される形態形成カルス、好ましくは胚形成カルの形態形成セクター、好ましくは胚形成セクターを次に従来方法（例えばVasil (1988) 前出及びLazzeri及びLä rz (1988) 前出の引用文献参照）で正常表現型（例えば成熟及び雄性）植物に再生することができる。こうして得られた再生植物はトランスジェニックであり、核ゲノムに安定的に組み込まれた選択可能又はスクリーン可能なマーカー、好ましくは選択可能なマーカーを少なくとも有する。次に例えばサザンブロッティング及び／又はポリメラーゼ鎖反応（Sambrookら (1990) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory）のような従来方法で他の着目遺伝子の存在及び発現を調べることができる。

本発明の目的では、本発明の形質転換及び再生手順により産生されるような正常表現型植物は、形質転換中に植物

本発明の方法は未成熟及び成熟接合体胚、葉基部、花序等のような種々の外植片から誘導される外植片の in vitro 培養中に緻密な胚形成カルのような緻密な形態形成カルスが得られる全単子葉植物種に適用することができる。本発明の方法は経済的に重要なイネ科作物、特にトウモロコシ、コムギ、イネ、エンバク、オオムギ、モロコシ、ライムギ及びアワのような主要穀類の形質転換に特に有用である。本発明のトランスジェニック植物は、農学的価値の高い新規系統及び／又は栽培変種植物を迅速且つ効率的に創製するために使用することができる。この点で、本発明によると、（参考資料として本明細書の一部に加える）EP412006に開示されているようなハイブリッド種子の作出用授粉植物、例えば雄性不稔性授粉植物として使用可能なトランスジェニック植物を創製することができる。

本発明は、形質転換した形態形成カルス、好ましくは緻密な胚形成カルの培養物を生成するために無傷組織又は緻密な胚形成カルスを使用して単子葉植物を形質転換するための迅速で効率的で且つ再現可能な方法を提供する。無傷組織も緻密な胚形成カルスも一般には安定的形質転換株

のゲノムに導入されるDNAフラグメントの発現により付加又は変化した特徴以外の如何なる表現型特徴においても同一系統の未形質転換植物と実質的に相異しない少なくとも1種の植物として理解されるべきである。当然のことながら、植物を形質転換するためのどの手順を使用した場合にも、種々の表現型を示す多数のトランスジェニック植物が通常生成され、そのうちで一部のみが上記に定義したような正常表現型である。

を得るために適切な出発物質として認められていない（Vasil (1990) *Bio/Technology* 8:797）ので、これは驚くべき知見である。本発明に従って無傷組織又は緻密な胚形成カルスを使用すると、1) DNA取り込み、2) 組込み的形質転換及び3) 効率的で再現可能な単子葉植物再生に関してコンピテントな受けやすい胚形成カルス、胚形成細胞懸濁液培養物及び／又はプロトプラストを使用することが必要であった既存の単子葉形質転換方法を著しく改善することができる。従来ではこのようなコンピテンスの必要により、単子葉類の安定的形質転換は非常に特定の組織培養物特性を有する植物系統に限られていた。例えばトウモロコシでは、コンピテントな懸濁液培養物及び／又はプロトプラストを相当の頻度で得られる十分なタイプIIカルスを形成する（即ち10%以上、例えば80%以上までの頻度でタイプIIカルスを形成する）能力を有するのは、近交系A188のような特定の系統に限られていた。しかしながら、このようなトウモロコシ系統はいずれも農学的価値が低く、従って、適当な組織培養特性を形質転換可能な低価値系統から有用なトウモロコシ系統に移入するといった労力のかかる育種プ

プログラムを使用しなければ、経済的に価値のあるトウモロコシ系統を形質転換することはできなかった。

本発明の方法は比較的短時間の *in vitro* 培養しが必要としないので、従来方法よりも時間及び労力を著しく節約できる。組織培養時間が短いため、ソマクローナル変異の発生を少なくすることもできる。

本発明の方法は、核ゲノムに安定的に組み込まれた少なくとも1個の(外来)着目遺伝子で形質転換された新規な正常表現型(例えば隐性)トランスジェニック単子葉植物、特にイネ科植物、より特定のには穀類、最も特定のにはトウモロコシ及びイネを提供する。本発明の方法は、形質転換される植物の遺伝子型から独立しており、緻密な胚形成カルスがその組織の少なくとも1個から得られるような任意の植物の細胞を形質転換することが可能であると考えられる。従って、単子葉種の大部分及び各種内の実質的数の系統を形質転換することが可能になる。更に、緻密な胚形成組織を形成する能力を有するある系統から有さない別の系統に従来の育種プログラムによりこのような能力を伝達することができる。

形質転換した胚形成カルス、特に形質転換した緻密な

胚形成カルスから再生される本発明の新規トランスジェニック単子葉植物は、例えばDattaら(1990)前出、Shimamotoら(1989)前出、Hayashimotoら(1990)前出、Gordon-Kammら(1990)前出、及びFrommら(1990)前出に記載されているような従来の培養条件を使用してこのような単子葉植物から胚形成懸濁液培養物及び/又はプロトプラストを得ることが実際に不可能であること又は、安定的に形質転換された後に正常表現型(例えば隐性)トランスジェニック植物として再生される十分な能力を有する胚形成懸濁液培地及び/又はプロトプラストを得ることが実際に不可能であることを特徴とする。この第2番目の特徴に関しては、1)正常表現型植物に再生できる確率が高く、2)DNA取り込み及び/又は取り込まれたDNAの組込みの形質転換に関してコンピテントである確率が高く、3)こうして形質転換された場合に正常表現型トランスジェニック植物に再生できる確率が高いこのような単子葉植物の胚形成懸濁液培養物又はプロトプラストを得ることは実際的でないと考えられる。

特に本発明は、例えばShiら(1990) Plant

Mol. Biol. Report. 8:276, Dattaら(1990) Plant Sci. 67:83及びDattaら(1990) Plant Cell Rep. 9:253に記載の手順に従って(取得可能な場合に)胚形成懸濁液培養物を一般に取得することができ、例えばShi及びMurai(1990) Plant Cell Rep. 9:216により記載されている手順に従って胚形成懸濁液培養物から(取得可能な場合に)プロトプラストを一般に取得できるようなイネ系統の新規トランスジェニックイネ植物を提供する。一方、例えばShimamotoら(1989)前出、Dattaら(1990)前出及びHayashimotoら(1990)前出に記載されているような従来の培養条件下では、このようなイネ系統の胚形成懸濁液培養物又はプロトプラストから正常表現型(例えば隐性)植物を再生することはできない。

本発明は更に、例えばShillitoら(1989) Bio/Technology 7:581, Prioli及びSøndahl(1989) Bio/Technology 7:589, Gordon-Kamm

ら(1990)前出、並びにFrommら(1990)

前出により記載されている手順に従って(取得可能な場合に)胚形成懸濁液培養物を一般に取得することができ、例えばShillitoら(1989)前出並びにPrioli及びSøndahl(1989)前出により記載されている手順に従ってこのような胚形成懸濁液培養物から(取得可能な場合に)プロトプラストを一般に取得できるようなトウモロコシ系統の新規トランスジェニックトウモロコシ植物を提供する。一方、例えばShillitoら(1989)前出、Prioli及びSøndahl(1989)前出、Gordon-Kammら(1990)前出並びにFrommら(1990)前出により記載されているような従来の培養条件下では、このようなトウモロコシ系統の胚形成懸濁液培養物又はプロトプラストから正常表現型(例えば隐性)植物を再生することはできない。更に、このようなトウモロコシ系統は高頻度でタイプIカルスを形成する能力を有するが、10%以上の頻度、特に1%以上、より特定のには0.1%以上、更に特定のには0.01%以上の頻度でのタイプIIカルスを形成する能力をもたない。タイプIIトウモロコシカルスは、安定的に形

質転換できる胚形成懸濁液培養物及び再生可能なプロトプラストが適切に得られるトウモロコシカルス組織の唯一の型であり、従って、特定のトウモロコシ系統でタイプIIカルスを得られないことは、このようなトウモロコシ系統の形質転換カルスから正常表現型（例えば成熟）トランスジェニックトウモロコシ植物を従来再生できなかったことを意味する。特定のトウモロコシ系統からタイプIIカルスを実際に得られるか否かは、Gordon-Kammら（1990）前出及びFrommら（1990）前出とその引用文献により記載されている一般手順により調べることができる。この検査によると、例えばトウモロコシ系の1000個の未成熟胚からカルス培養を開始することができ、3週間おきにサブクロニングすることにより培養を維持することができ、典型的なタイプIIカルスに最も近い培養物のみを継代培養することができ、6カ月後にどの程度の頻度で均質なタイプIIカルスが得られるかを決定することができる。

より一般的には、単子葉種の特定の系統から再生可能なプロトプラストを実際に得られるか否かを決定するためには、以下に述べるような周知手順をとることができる。こ

ロトプラスト10000個当たり約500以下、特に約100以下、特定のには約10以下、より特定のには約1以下の正常表現型（例えば雄性）植物しか再生できない場合には、特定の単子葉系統は植物形質転換に適切な再生可能なプロトプラストを提供するために適切でないと判断することができる。

以下、実施例により本発明を説明する。特に指定しない限り組換えDNAを操作するための全実験手順は、Sambrookら（1990）Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratoryに記載されている標準化手順により実施した。オリゴヌクレオチドはKramer及びPritz（1968）

Methods in Enzymology 154:350に要約されている一般規則に従って設計し、Beaucage及びCaruthers（1981）Tetrahedron Letters 22:1859のホスホラミジト法によりApplied Biosystems 380A DNA合成器（Applied Biosystems B.V., Maarssen, N

etherlands）で合成した。実施例で使用した以下の細菌株及びプラスミドはDeutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen（DSM）、Mascheroder Weg 1B, Braunschweig, Germanyから入手可能である。

れについては、任意の特定の単子葉類で従来手段により生成及び維持され得る胚形成懸濁液培養物から、再生可能なプロトプラストが効率的且つ確実に生成されと考えられる。胚形成懸濁液培養の程度及び品質は一般にその遺伝子型に依存し、一般に胚形成懸濁液培養物が植物を再生可能である場合には形質転換のために植物系統のプロトプラストを形成することしか価値がない。胚形成懸濁液培養物は一般に、細胞質に塞んだ胚形成細胞の十分に分散した小群から構成され、カルス組織又は有機化分裂組織を含まず、27～32時間の細胞倍加時間を有しており、体細胞胚及び植物を形成することが可能であるという特徴を有する（Vasil（1988）Bio/Technology 6:397）。単子葉種の特定の系統の胚形成懸濁液培養物が植物再生に適切であるか否かを決定するには、多数（即ち少なくとも100個）の細胞集合体を適切な再生培地におき、どの程度の割合の集合体が正常表現型雄性植物をもたらしかを決定すればよい。正常雄性植物が細胞集合体の50%以上から得られる場合には、一般にプロトプラスト生成を続行すべきであると判断される。一方、従来のプロトプラスト単離、培養及び植物再生技術を使用してア

etherlands）で合成した。実施例で使用した以下の細菌株及びプラスミドはDeutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen（DSM）、Mascheroder Weg 1B, Braunschweig, Germanyから入手可能である。

細菌株	プラスミド	DSM番号	寄託日
大腸菌WK8	pMe5-8	DSM 4567	1988年5月3日
大腸菌WK8	pMe5-8	DSM 4568	1988年5月3日

実施例1: DNAを接合体の未熟な胚にエレクトロポレーションすることによる選択可能なマーカー遺伝子を持つトウモロコシの形質転換

約0.5~1mmの接合体の未熟な胚を、2種類のトウモロコシの自家授粉系(Pa91及びH99)から生長させた種から単離した。新しく単離した胚を、酵素溶液I[10% マンニトール及び5mM 2-[N-モルフォリノ]エタンスルホン酸(HES), pH5.8を含むCPM塩(Powell & Chapman: 1985 "Plant Cell Culture, A Practical Approach", R.A.Dixon編., 第3巻)中の0.3% macerozyme(Kinki Yakult, Nishinomiya, Japan)]で1~2分酵素処理した。この酵素溶液中で1~2分インキュベーションした後、胚を注意深く、N6培液(6mM アスパラギン、12mM プロリン、1mg/l チアミン-HCl、0.5mg/l ニコチン酸、100mg/l カゼイン水解物、100mg/l イノシトール、30g/l 蔗糖及び54g/l マンニトールを補ったN6培地[Chuら(1975)Sci.Sin.Peking 18:659]のマクロ-及びミクロ-エレメント)で洗浄した。洗浄後、胚をトウモロコシエレクトロポレーション緩衝液、EPH-NaCl[150mM NaCl, 5mM CaCl₂, 10mM HEPES(N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸)及び0.425M マンニトール, pH7.2]中

でインキュベートした。200μl EPH-NaCl中の約100個の胚を、各キュベットに配置した。HindIIIで直線化したプラスミドDNA、pDE108約20μgを各キュベットに添加した。pDE108は、5399 bp プラスミドであり、その全配列はSeq.Id. No.1に記載されており、35S3プロモーター(EP359817)の制御下でカナマイシン耐性遺伝子(neo)からなるキメラ遺伝子を含む。

外植片で1時間DNAをインキュベーションした後、キュベットを氷浴に移した。氷上で10分インキュベーション後、エレクトロポレーションを実施した: 375 V/cmの電界強度のパルス1個を900μFコンデンサーから抜き出した。エレクトロポレーション装置は、Dekeyserら(1990)の記載と同じものであった(The Plant Cell 2:591)。エレクトロポレーション直後、新しい液体N6培液を、キュベット中の外植片に添加し、この後、外植片をさらに氷上で10分間インキュベーションした。

その後、胚を0.2Mマンニトールを補った、Habl VII基質[100mg/l カゼイン水解物、6mM プロリン、0.5g/l HES, 1g/l 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)並びに0.75g/l NaCl及び1.8g/l Phytigel(Sigma Chemical Company, St

Louis, Mo, U.S.A.)で固化した2%蔗糖, pH5.8を補ったN6培地のビタミン並びにマクロ及びミクロエレメント)に移した。系H99及び3日後及び系Pa91で2日後、胚を200mg/lカナマイシンを補った同一基質に移した。約14日後、胚をカナマイシンを補った、マンニトールを含まないHabl VII基質に移した。さらに胚を約2月間、この選択的基質上で継代培養し、約3週間の間隔をあけて継代培養した。誘導した胚形成組織を注意深く単離し、系H99に関しては5mg/l 6-ベンジルアミノプリンを、系Pa91に関しては5mg/l ゼラチンを補ったMS培地[Murashige及びSkoog(1962)Physiol. Plant 15:473]に移した。胚形成組織をこの培地上で約14日間保持し、次いで、系H99に関してはホルモン及び8% 蔗糖を含まない、系Pa91に関しては3% 蔗糖を含まないMS培地に移した。発育した芽をさらに通常の苗に発育する間、1.5% 蔗糖を含む1/2 MS 培地に移した。これらの苗を土壌に移し、温室栽培した。

実施例2: 実施例1で形質転換したトウモロコシ植物の特徴付け

実施例1からの17本の植物を、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)によりキメラneo遺伝子の存在下で分析した。約10~20mg

の組織量に合わせたDeilaportaら[(1983)Plant Mol.Biol. Reporter 1:19]により記載されたプロトコルに従ってDNAを調製した。各植物毎に、特定量の組織をマイクロファージ管中の抽出緩衝液でゆやかした。neo遺伝子のコード配列の一部に対応する706bpフラグメントを、ヌクレオチド1384~1406及び2089~2087(Seq.Id.No.1)の番号)のプラスミドpDE108の配列に相補的なオリゴヌクレオチドプローブを使用して、Sambrookら[(1990),同上]により記載のプロトコルに従ってポリメラーゼ鎖反応で増幅した。アニール温度50℃で全部で35サイクル実施した。最終DNAを、1.5%アガロースゲル上の電気泳動により分析した。706bpフラグメントが全部で13本の植物で同定された。後段で陽性の植物のうち1本が枯死した。

neo遺伝子[即ち、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ[(NPTII)]の発現産物の活性を、以下の如く植物9本で分析した。粗抽出物を、抽出緩衝液[McDonnellら(1987)Plant Molecular Biol.Reporter 5:380]中で植物組織を粉砕することにより調製した。抽出物をReissら[(1984)Gene 30:211]に記載のプロトコルに従って、非-変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。NPTII活性を、基質[McDonn

ellら(1987)上述]として[γ - 32 P]ATPを使用するカナマイシンの *in situ* ホスホリル化により分析した。NPTII活性は、試験した植物の内8本で知見された(図1)。

PCR及びNPTIIの両方のアッセイで陽性であることが知見された植物の内1本(H99-M148-1)をさらに、サザンハイブリダイゼーションにより分析した。ゲノムDNAは、残りのRNAを除去するためにRnaseを用いる処理を補ったDellaportaら[(1983)上述]に記載のプロトコルに従って植物組織から調製した。形質転換していないH99植物を対照として使用した。DNAサンプルを以下の制限酵素: BglII, EcoRI, EcoRV, HindIII, BaeHI, PvuI, PvuIIまたはPstIで消化し、次いで水平方向アガロース電気泳動にかけた。製造業者(Amersham Hybond-N+リーフレット)により推奨されたように、"Alkali Blotting of DNA"プロトコル及び続くハイブリダイゼーションによりHybond+(Amersham International PLC, Amersham, United Kingdom)膜へのサザントランスファーを実施した。公開方法[Feinberg及びVogelstein(1983)Anal. Biochem. 132:6]から誘導した製造業者により供給されたプロトコルに従って、マルチプライムDNAラベルキット(Amersham)を用いて放射性プローブを調製した。

(欠失した塩基には下線を引き、結合部に作り出したNcoI部位を強調した)作り出された。さらなる分析から、HindIII部位の回りでは植物ゲノムをフランクするプラスミドDNA配列は、全くまたは殆ど欠失していなかった。他の植物はこの方法では試験しなかったが、PCR及びNPTII分析から、キメラ遺伝子が存在し且つ発現することが知見された。

成熟した形質転換植物は繁殖可能であり、且つ表現型的にも全く正常であった。サザンハイブリダイゼーションにより予備分析した植物を、形質転換していない植物(トウモロコシ自家授粉系H99から2本及びトウモロコシ自家授粉系Pa91から1本)を用いた3つの交雑に於いて花粉媒介植物として使用した。全部で44本のF1子孫の植物を上記記載の如くNPTII活性に関して分析し、その内の20本が陽性であることが知見された。これは、通常のメンデルの分離の法則下で予想された1:1比とは大きく違っており、形質転換した花粉媒介植物がキメラneo遺伝子($X^2=0.38$)の1つの活性コピー(または、あるいは、複数の密接に結合した活性コピー)を持っていたと考えられる。

実施例3: 未成熟な胚の接合体から誘導した1型カルスにDNAをエレクトロポレーションすることによる選択的マ-

ブロープとして、もう一つのプラスミドから誘導した1184bp EcoRI-HindIIIフラグメントを使用した。このプラスミドの配列は、Seq.Id.No.2に記載されている。バンドパターン(例えば、図2参照)から、少なくともキメラneo遺伝子は、植物のゲノムDNAに組込まれたことが知見された。

この形質転換した植物(H99-M148-1)の詳細分析から、プラスミドpDE108の2個の殆ど完全なコピー及び3番目が転移したコピーの一部を保持していることが知見された。2個の殆ど完全なコピーは明らかにヘッド-テイルのコンカテマーの植物ゲノムに挿入される。しかしながら、幾つかの転移は、追加のNcoI部位及び追加のBglII部位が作り出されるように起きなければならなかったが、2個のコピーの結合部でのHindIII部位(エレクトロポレーション前のpDE108の直線化に使用した)が欠失していた。植物ゲノムで組込んだように、2個のプラスミドコピーの結合部のシーケンシングから、HindIII部位の突出5'末端のみが欠失していることが明らかになった。これにより、NcoI部位は以下のように:

```
ACCCA      +  AGCTTCGCG  =  AGCCATCGCG
TCGCTTCGA      ACCGC      TCGCTACCGC
```

キメラ遺伝子を用いるトウモロコシの形質転換

長さ約0.5~1mmの未成熟な胚の接合体を、トウモロコシ自家授粉系Pa91の発芽種から単離し、次の離体培養までの間隔を約14日間として、NahI VII基質上で培養した。胚形成組織を発育型(developing type)Iカルスから注意深く切開した。最後にEPN中の胚形成組織(NaClを含まないEPN-NaCl)を、最大長さ約1.5mmのフラグメントに切断した。得られたカルスフラグメントをこの緩衝液中で3時間、予備原形質分離した。3時間後、カルスフラグメントをEPN-NaClに移入した。カルスフラグメント約100~150mgを、キューベツト1個当たり200 μ l EPN-NaClに移入した。HindIIIで直線化したプラスミドpDE108(Seq.Id.No.1)の20 μ g DNAを各キューベツトに添加した。DNAを1時間カルスフラグメントとインキュベートし、その後、キューベツトを氷浴に移した。

氷上で10分インキュベーション後、エレクトロポレーションを実施した。375V/cmの電界強度のパルス1個を、900 μ Fコンデンサから取り出した。エレクトロポレーション装置は、Dekeyserら[(1990)上述]の記載と同じものであった。エレクトロポレーション直後、8mM アスパラギン、12mM

ブロリン、1mg/l チアミン-HCl、0.5mg/l ニコチン酸、100mg/l カゼイン水解物、100mg/l イノシトール、300mg/l 蔗糖及び54mg/l マンニトールを補った、新しい液体N6aph基質をカルスフラグメントに添加し、次いでさらに水上で10日間インキュベートした。

1mg/l 2,4-Dを補った液体N6aph基質中で1日培養後、カルスフラグメントを、0.2M マンニトール及び200mg/l カナマイシンを補ったNahI VII基質に移した。14日後、カルスフラグメントを、マンニトールを含まない同一の選択基質で離代培養し、次いで約3週間の離代培養間隔を空けて約2月この基質でさらに培養した。得られたカルスの胚形成区域を、ベトベトした組織から分離し、3% 蔗糖及び発芽させるために5mg/l ゼラチンを補ったMS基質[Murashige及びSkoog(1962)Physiol. Plant 15:473]に移した。組織をこの培地で約2週間保持し、続いて3%または8% 蔗糖を含むMS培地に移した。この基質上に発育した芽を、さらに通常の苗に発育させるために1.5% 蔗糖を含む半分の強度のMS培地に移した。これらの苗を土壌に移し、温室栽培した。

実施例4：実施例3の形質転換したトウモロコシ植物の特

[(1984)Gene 30:211]に記載の方法に従って非-変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。NPTII活性を、基質(HeDonnellら、同上)として[γ - 32 P]ATPを使用して、カナマイシンの*in situ*ホスホリル化により分析した。NPTII活性は試験した植物のうち14本で知見された(図3)。NPTII陽性であった2本の植物は、PCRアッセイでは陰性であった。

PCR及びNPTIIアッセイの両方で陽性であったことが知見された植物のうち2本(Pa91-M148-2及びPa91-M149-1)を、サザンハイブリダイゼーションによりさらに分析した。ゲノムDNAは、残りのRNAを除去するためにRNaseとの処理を補ったDellaPortaら[(1983)上述]に従って植物組織から調製した。形質転換していないPa91植物を対照として使用した。DNAサンプルを以下の制限酵素:BglII、EcoRI、EcoRV、HindIII、BamHI、PvuI、PvuIIまたはPstIのうちの1種で消化し、次いで水平方向アガロース電気泳動にかけた。製造業者(Amersham)により推奨されたように、"Alkali Blotting of DNA"プロトコル及び続くハイブリダイゼーションによりHybond+膜へのサザントランスファーを実施した。公開方法[Feinberg及びVogelstein(1983)Anal. Biochem. 13

図付け

実施例3由来の29本の植物を、ポリメラーゼ鎖反応によりキメラneo遺伝子の存在について分析した。DNAは、約10~20mgの組織量に適用するために合わせたDellaPortaら[(1983)Plant Mol. Biol. Reporter 1:19]に従って調製した。各植物に毎に、特定量の組織をマイクロチューブ中の抽出緩衝液中にふやかした。neo遺伝子のコード配列の一部に対応する706bpフラグメントを、ヌクレオチド1384~1408及び2088~2087(Seq. Id. No. 1の番号)のプラスミドpDE108の配列に相補的なオリゴヌクレオチドアプローブを使用してSambrookら[(1990)上述]に記載のアプローチに従ったポリメラーゼ鎖反応で増幅した。アニール温度50℃で全部で35サイクル実施した。最終DNAを1.5%アガロースゲル上で電気泳動により分析した。706bpフラグメントが全部で14本の植物で同定できた。陽性の植物の内1つは後段で枯死した。

neo遺伝子のNPTII発現産物の活性を、以下のように24本の植物で分析した。粗抽出物は、植物組織を抽出緩衝液[HeDonnellら(1987)Plant Molecular Biol. Reporter 5:380]中で粉砕することにより調製した。次いで抽出物をRsaI

2:6から誘導した製造業者により供給されたプロトコルに従って、マルチプライムDNAラベルキット(Amersham)を用いて放射性アプローブを調製した。アプローブとして、もう1個のプラスミドから誘導した1184bp EcoRI-HindIIIフラグメントを使用した。このプラスミドの配列は、Seq. Id. No. 2に記載されている。バンドパターン(例えば、図4参照)から、少なくともキメラneo遺伝子は、植物のゲノムDNAに組み込まれたことが知見された。

この形質転換した植物(R99-m148-2)のさらなる分析から、プラスミドpDE108の2個の殆ど完全なコピーは、ヘッド-テイル配置で保持されていることが知見された。2個のコピーの結合部でのHindIII部位(エレクトロポレーション前のpDE108の直線化に使用した)が欠失していた。植物ゲノムに組み込んだように、2個のプラスミドコピーの結合部のシーケンシングから、HindIII部位の突出5'末端+HindIII部位の一方の下流の1個の塩基が以下のように：

```

ACCCA      +      AGCTTGGCG      =      ACCCAGCCG
TCGGTTCGA      ACCCG      TCGGTCCCG

```

欠失していることが明らかになった(欠失した塩基には下線を引いた)。さらなる分析から、植物ゲノムをフランキ

ングするHindIII部位の回りではプラスミドDNAは、全くまたは殆ど欠失していなかった。他の植物はこの方法では試験しなかったが、PCR及びNPTIIアッセイから、キメラ遺伝子が存在し且つ発現することが知見された。

成熟した形質転換植物は繁殖可能であり、且つ表現型にも完璧に正常であった。サザンハイブリダイゼーションにより予備分析した植物のうち1本を、形質転換していない植物(トウモロコシ自家授粉系B99)を用いた交雑に於いて花粉媒介植物として使用した。全部で20本のF1子孫の植物を上記記載の如くNPTII活性に関してアッセイし、その内の6本が陽性であることが知見された。これは、通常のメンデルの分離の法則下で予想された1:1比とは大きく違っており、形質転換した花粉媒介植物がキメラneo遺伝子

($X^2=3.2$)の1個の活性コピーを持っていたと考えられる。

実施例5: 未成熟の胚の接合体にDNAを遺伝子エレクトロポレーションすることによる遺伝的不発性遺伝子及び選択可能なマーカーを有するトウモロコシの形質転換

約1~1.5mmの未成熟の胚の接合体を、トウモロコシ自家授粉系B99の発育した種から単離した。新しく単離した

胚を酵素的に処理し、実施例1の記載通りに洗浄した。洗浄後、胚をトウモロコシエレクトロポレーション緩衝液、EPH-KCl(80mM KCl, 5mM CaCl₂, 10mM HEPES及び0.425M マンニトール, pH7.2)に設置した。200μl EPH-KCl中の約100個の胚を各キューベットに載せた。プラスミドDNA、HindIIIで直線化したpVE107約20μgを各キューベットに添加した。pVE107は、pTTN8の1287bpのEcoRV-EcoRIフラグメント(EP 344 029; Seq. Id. No. 3)をプラスミドpDE108(Seq. Id. No. 1)の大きなXbaI(クレンウで充填した)-EcoRIフラグメントに結合することにより得られた8859bpプラスミドである。pVE107は、35Sプロモーターの制御下でカナマイシン耐性遺伝子(neo)からなるキメラ遺伝子及び*Nicotiana tabacum*のTA29遺伝子の芽胞-特異的プロモーターの制御の下でbarnase遺伝子(Hartley(1988) J. Mol. Biol. 202:913)からなるもう1個のキメラ遺伝子を含む。

barnase遺伝子のフラグメントを含む全ベクター構築は、プラスミドpHe5B8を含む*E. coli*株WR8で実施した。pHe5B8は、lacプロモーターの制御下でbarstar遺伝子(barnase阻害剤をコードする)を含む[De Boerら(1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21]。このプラスミドは、

プラスミドpMT41BのEcoRI-HindIIIフラグメント[Hartley(1988)参照]をプラスミドpHe5-8(DSM 4566)のEcoRI及びHindIII部位にクローニングし、次いで

Sollazzoら[(1985) Gene 37:199]に通常記載のlooping-out突然変異発生により、phoAシグナル配列の開始コドンで始まり、barstarコード領域の翻訳開始コドンの前の最後のヌクレオチドで終結する配列を除去することにより構築する。

DNAを外植片と1時間インキュベーションした後、キューベットを氷浴に移した。氷上で10分間インキュベーション後、実施例1に記載の如くエレクトロポレーションを実施した。エレクトロポレーション直後、新しい液体NBaph基質をキューベット中の外植片に添加し、この後、外植片を氷上でさらに10分間インキュベートした。

その後、胚を0.2M マンニトール及び200μg/lカナマイシンを補ったMshI VII基質に移した。約14日後、胚をマンニトールを含まないが、同一選択剤、カナマイシンを含むMshI VII基質に移した。胚を、約3~4週の継代培養期間隔で、約2箇月この選択的基質上でさらに継代培養した。誘導した胚形成組織を注意深く単離し、5μg/l 6-ベンジルアミノ

プリンを補ったMS培地[Murashige及びSkoog(1962)同上]に移した。胚形成組織をこの培地上で約14日間保持し、次いでホルモン及び蔗糖を含まないMS培地に移した。生長した新芽を、通常の苗に生長させるために、1.5% 蔗糖を含む1/2 MS培地に移した。これらの苗を土壌に移し、温室で栽培した。

実施例6: 実施例5の形質転換した植物の特徴付け

実施例5からの7本の植物、RZM19-2、RZM19-3、RZM19-4、RZM19-5、RZM19-6、RZM19-7及びRZM19-8を、同一胚形成カルス集団から誘導した。これらを拡張サザン分析にかけた。この場合、BamHI-HindIIIで消化した植物のゲノムDNAをpVE107及びpTTN8の小さなEcoRV-XbaIフラグメント(PTA29-barnaseを含む; Seq. Id. No. 3参照)でプローブした。総ての植物に於いて、最も強く検出された帯は、予想した1400bpフラグメントであった。しかしながら、これら及び他のサザンプロットで知見されたパターンは、非常に複雑で、形質転換によりpVE107の総てまたは一部が植物のゲノムに多く挿入されたことを示していた。pVE107の挿入されたコピーの幾つかは、明らかに不完全であるか及び/または転位が起きていた。しかしながら、幾つかの複雑な組込みパ

ターンは7本の植物総てに知見された。これは、7本の形質転換体が極めて1個の胚形成カルス集団から誘導されたという事実により説明できた。

形質転換した植物は、不稔性の雄株であったが、これ以外には表現型的にも完全に正常であった。雄株の生殖力は正常であった。雄花の小穂花は、ほとんど正常の長さであったがしかし非常に薄く、空のようであり、全く開かなかった。詳細な分析から葯は殆ど微細な構造に縮んでいることが知見された。この表現型は、*barnase*遺伝子の少なくとも1個のコピーが発現されただけでなく、葯の組織の一部または全体で選択的に発現したことも示している。

形質転換体RZN19-3は、形質転換していないH99植物からの花粉で授粉し、53本の子孫の苗を回収した。53本の苗の内、32本(60%)は、NPTIIアッセイで陽性であったが、21本(40%)はNPTII陰性であった。F1子孫に於けるこの割合は、通常のメンデルの分離の法則下で予測された1:1比とは大きく離れておらず、形質転換した雄親がキメラ^{neo}遺伝子($X^2=2.28$)の1個の活性コピーを有していたと仮定できる。NPTII陰性の子孫は生殖力のある雄株であったが、NPTII陽性の子孫は不稔性であった。

242236)；及び*N. tabacum*のTA29遺伝子(EP344028)の芽胞-特異性プロモーターの制御下で、*barnase*遺伝子[Harley (1988)同上]からなるもう1個のキメラ遺伝子を含む、*barnase*遺伝子からなるDNAフラグメントを含む全ベクター構築を、実施例5のプラスミドpMa5BSを含む*E. coli*株MK6で実施した。

DNAを外植片と1時間インキュベーションした後、キュベットを氷浴に移した。氷上で10分インキュベーション後、実施例1に記載の如くエレクトロポレーションを実施した。エレクトロポレーション直後、新しい液体H6aph基質をキュベット中の外植片に添加し、この後、外植片を氷上でさらに10分インキュベートした。

その後、一つのエレクトロポレーション実験からの胚を、0.2Mマンニトール及び2 mg/l PPTを補ったMhI VII基質に移した。約14日後、胚をマンニトールを含まない、2 mg/l PPTを補ったMhI VII基質(実施例1のMhI VII基質であるが、アロリン及びカゼイン水解物を含まない)に移した。約4週間後、胚を、10 mg/l PPTを補ったMhI VII基質上で1箇月継代培養した。誘導した胚形成組織を注意深く単離し、5 mg/l 8-ベンジルアミノプリンを補ったMS培地に

NPTII陽性の子孫植物31本を、サザン分析にかけた。これらの植物のうち28本は、これらが誘導された元の形質転換体RZN19-3と同じ組込みパターンを示した。残りの3本の植物は、やや異なったパターンを有していた。

実施例7：DNAの未熟な接合体胚へのエレクトロポレーションによる不稔性の雄の遺伝子及び除草剤耐性遺伝子をもつトウモロコシの形質転換

トウモロコシ近親自家授粉系H99の接合体の胚を単離し、酵素的に処理し、洗浄し、次いで実施例5に記載の如くエレクトロポレーション緩衝液に設置した。各キュベット毎に200 μ l EPM-KCl中の約100個の胚を設置した。HindIIIで直線化したプラスミドDNA、pVE108約20 μ gを各キュベットに添加した。pVE108は、PTM8の1287bp EcoRV-EcoRIフラグメント(EP 344029；Seq. Id. No. 3)をプラスミドpDE110の大きなEcoRI-SluIフラグメント(Seq. Id. No. 4)に結合することにより得られた5820bp プラスミドである。pVE108は、35S3プロモーターの制御下で、ホスフィノトリシニアセチルトランスフェラーゼ(PAT)をコードし、除草剤のグルタミシンセターゼ阻害剤(例えば、ホスフィノトリシン:PP T)に対する耐性を与える^{bar}遺伝子を含むキメラ遺伝子(EP

移した。胚形成組織をこの培地上で約14日間保持し、続いて、ホルモン及び蔗糖を含まないMS培地に移した。生長した新芽をさらに通常の苗に生長させるために、1.5%蔗糖を含む1/2 MS培地に移した。これらの苗は、2 l/haに相当するBASTA(登録商標：Hoechst AG製、Frankfurt am Main, Germany)をin vitroで噴霧しても生存した。次いで、これらの苗を土壌に移し、温室栽培した。この形質転換した苗のうち2本、RZN35-1及びRZN35-18をさらに特徴つけた(実施例8参照)。

第2のエレクトロポレーション実験からの胚を、2 mg/l PPT及び0.2M マンニトールを補ったMhI VII基質に移した。約14日後、胚を、マンニトールを含まない2 mg/l PPTを補ったMhI VII基質に移した。さらに約3週間後、胚をマンニトールを含まない、10 mg/l PPTを補ったMhI VII基質に移した。さらに3週間後、誘導した胚形成組織を注意深く単離し、2 mg/l PPT及び5 mg/l 8-ベンジルアミノプリンを補ったMS培地に移した。胚形成組織をこの培地上で約14日間保持し、続いて、ホルモン、蔗糖またはPPTを含まないMS培地に移した。さらに通常の苗に生長させるために、生長した新芽を1.5%蔗糖を補った1/2 MS培地に移した。

得られた苗を土壌に移して、温室栽培した。形質転換した苗のうち3本、RZM34-1、RZM34-12及びRZM34-14をさらに特徴つけた(実施例8参照)。

実施例8：実施例7の形質転換したトウモロコシ植物の特徴づけ

実施例7のRZM34-1、RZM34-12、RZM34-14、RZM35-1及びRZM35-18を温室内で生長させた。植物の葉に於ける \bar{bar} 遺伝子の発現産物の活性を、以下の“PATアッセイ”で分析した。各植物からの葉の組織100mgを、酸で処理した海砂(Merck, Darmstadt, Germany)50mg及びポリビニルポリピロリドン(PVPP)5mgと一緒に、エッペンドルフ管中、抽出緩衝液(25mM Tris-HCl pH7.5, 1mM Na₂-EDTA; エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩, 0.15mg/mL フェニルメチルスルホニルフルオリド; PHSF, 0.3mg/mL ジチオトレイトール; DTT及び0.3mg/mLウシ血清アルブミン)50μL中でガラス棒で粉砕した。抽出物を、マイクロチューブ管中、18000rpmで5分間遠心分離した。上清を回収し、TE 25/μL(25mM Tris-HCl pH7.5, 1mM Na₂-EDTA)で10倍に希釈した。希釈した抽出物12μLに、1mM PPTのTE 25/μL中の1μL、2mM アセチル補酵素AのTE 25/μL中の1μL及び[¹⁴C]アセチル補酵素

A (60mCi/mmol, 0.02mCi/μL; NEH Research Products, DUPONT, Wilmington, Delaware, USA)2μLに添加した。反応混合物を37℃で30分インキュベートし、濃縮領域を有するアルミニウムシートシリカゲル60t.l.c.プレート(Merck)にスポットした。上昇クロマトグラフィーを、1-プロパノール及びNH₄OHの3対2混合物(25% NH₄)で実施した。オートラジオグラフィー(XAR-5 Kodak film)に一晩かけることにより、¹⁴Cを視覚化した。

除草剤BASTA(登録商標)に対する耐性を、植物1本当たり葉1枚の上面に近い小領域に除草剤1%溶液をはけで塗り、塗った部位及び近隣に於ける損傷兆候を観察することにより試験した。RZM34-1、RZM35-1及びRZM35-18は、全く損傷兆候を示さなかったが、RZM34-12及びRZM34-14は、塗った部位がやや茶色になり、乾燥していた。

RZM34-1、RZM34-12、RZM34-14、RZM35-1及びRZM35-18は、不陸性の雄株であることが判明した。これらの植物の各々の表現型は、実施例6で分析した実施例5の形質転換体に関して記載したものと同一であった。

サザン分析から、RZM35-1及びRZM35-18は、各々のゲノムにプラスミドpVE108の1個のコピーが存在する、同一組

込みパターンを有することが知見された。HindIII部位の近隣のプラスミドDNA配列の小さな部分(エレクトロポレーション前に直線化するために使用した)は、組込みコピーには存在しないようであった。RZM34-1、RZM34-12及びRZM34-14のサザン分析から、これらの植物の各々は、多分そのゲノム中に組込まれたpVE108の一部または全部の2個または3個のコピーを有していることが知見された。このコピーは、コンカチマー配置中に殆ど同様に挿入されない。

形質転換体RZM35-1及びRZM34-1を、形質転換していないH99植物からの花粉で授粉し、子孫の苗を回収した。RZM35-1から回収した苗35本のうち、18本(48%)はPATアッセイで陽性であったが、19本(54%)はPAT陰性であった。F₁子孫に於けるこの割合は、キメラ \bar{bar} 遺伝子($X^2=0.26$)の1個の活性コピーの通常のメンデルの分離の法則下で予測された1:1比とは大きくずれていない。

RZM34-1から回収した苗34本のうち、19本(58%)はPATアッセイで陽性であり、15本(44%)はPAT陰性であった。F₁子孫に於けるこの比は、通常のメンデルの分離の法則下で予測した1:1比から大きくずれておらず、形質転換した雄親が、キメラ \bar{bar} 遺伝子($X^2=0.47$)の1個の活性コピーま

たは活性であるが、密着結合した複数のコピーを有していたと考えられる。

実施例9：乾燥種から誘導した胚形成カルスにDNAをエレクトロポレーションすることによる、除草剤耐性遺伝子を有するコメの形質転換

コメ栽培変種植物Hippobareの皮を剥いた成熟種を、表面滅菌し、0.5mg/Lニコチン酸、0.5mg/Lピリドキシン-HCl、1.0mg/Lチアミン-HCl、2.0mg/L2,4-D、30g/L蔗糖及び2.0g/LPhytigel,pH5.8を補った固体2N6培地[N6培地(Chuら, 1975, 同上)]に設置し、27℃で暗所培養した。カルスが3~4週間以内に胚の胚盤から生長した。一次(primary)カルスの胚形成部分を、胚盤胚形成カルスに増殖させるために、0.5mg/Lニコチン酸、0.5mg/Lピリドキシン-HCl、1.0mg/Lチアミン-HCl、2.0g/Lカサミノ酸(Vitamin assay,Difco)、1.0mg/L2,4-D、0.5mg/L8-ベンジルアミノプリン、20g/L蔗糖、30g/Lソルビトール及び2.0g/LPhytigel,pH5.8を補ったN8培地(N8培地;Chuら, 1975, 同上)に移した。

継代培養して3~4週間後、胚形成カルスを形質転換実験に使用した。カルスを、最大長さ約1.5~2mmのフラグメ

ントに切り出した。カルス片をEPN中で2回洗浄し、次いで、室温(25℃)で30分から3時間、この緩衝液中で前原形質分離した。次いで、カルスフラグメントをEPN-KCIで2回洗浄し、エレクトロポレーションキュベットに移した。各キュベットには、100~200 μ l EPN-KCI中のカルスフラグメント約150~200 μ gを載置した。プラスミドDNA、環状pDE110またはHindIII若しくはEcoRIで直線化したpDE110の10~20 μ gを各キュベットに添加した。pDE110は4883bpプラスミドであり、その全配列はSeq. Id. No. 4に記載済みである。このプラスミドは、35S3プロモーターの制御下で**hsp**遺伝子からなるキメラ遺伝子を含んでいる。

DNAを、室温で約1時間カルスフラグメントとインキュベートした。次いで実施例1に記載の如くエレクトロポレーションを実施した。エレクトロポレーション後、カサミノ酸を含まない液体N87培地をカルスフラグメントに添加した。次いでカルスフラグメントを、カサミノ酸を含まないが、5、10または20 μ g/l PPTを補った固体N87培地に載置し、約4週間、16/8時間の明/暗レジメ下で、27℃でこの選択培地上で培養した。生長したPPT-耐性カルスを単離し、カサミノ酸を含まないが5 μ g/l PPTを含む新しいN87培地

上で約2~3週間継代培養した。その後、選択したPPT-耐性カルスを、5 μ g/l PPTを補った植物再生培地N8H25 [0.5 μ g/l ニコチン酸、0.5 μ g/l ピリドキシン-HCl、1.0 μ g/l チアミン-HCl、288 μ g/l アスバリン酸、174 μ g/l アルギニン、7.0 μ g/l グリシン、1.0 μ g/l O-ナフタレン酢酸(NAA)、5.0 μ g/l カイネチン、20 μ g/l 蔗糖及び2.0 μ g/l Phytigel]を補ったN8培地(Chura; 1975, 同上)]に移した。苗を約1箇月生長させ、次いで0.5 μ g/l ニコチン酸、0.5 μ g/l ピリドキシン-HCl、1.0 μ g/l チアミン-HCl、1.0 μ g/l カサミノ酸、20 μ g/l 蔗糖及び2.0 μ g/l Phytigel, pH5.8を補ったホルモンを含まないN8培地(Chura, 1975, 同上)]に移した。この上でさらに2~3週間保持し、その後、土壌に移して温室栽培した。

上記の2N8、N87、N8H25及びホルモンを含まないN8培地の組成は、Japan Tobacco Inc., Plant Breeding and Genetics Research Laboratory, 700 Higashibara, Toyoda, Iwata, Shizuoka 438, JAPANから提供を受けた。

実施例10：実施例9の形質転換したコメ植物の特徴付け

種々の形質転換実験で得られた実施例9の2本の形質転換したコメ植物を、土壌で4週間栽培し、次いで2 μ g/haに

対応する用量でBASTA(登録商標)を噴霧した。2本の植物はBASTA(登録商標)耐性であり、除草剤処理でも生存したが、形質転換していない対照の植物は、萎縮し、除草剤を噴霧して4日以内に枯死した。

実施例9の2種類の形質転換実験から誘導した2本の植物及び他の4本の*in vitro*苗を、PvuIIで消化した植物ゲノムDNAをpDE110でプローブしたサザンハイブリダイゼーションにより分析した。この分析から、分析した総ての植物に於いて、pDE110の少なくとも1個のコピーがコメゲノムに組込まれたことが知見された。6本の植物のうち5本に於いて、35S-**hsp**キメラ遺伝子の殆どを含むpDE110フラグメントに対応する1.8kbフラグメントが、はっきりと特定できた。

実施例11：実施例2及び4の形質転換したトウモロコシ植物を用いる圃場試験

実施例2のトウモロコシ形質転換体H99-N148-1及び実施例4のトウモロコシ形質転換体Pa91-N148-2の子孫を、ベルギー(Afence)のPlant Genetic Systems N.V.実験農場で圃場条件下で試験した。圃場試験は、登録番号B10T/81/N05でベルギー農業省により許可された。F1、F2及びF3子

孫が、以下の表1に要約されたように交雑から得られた。総ての場合に於いて、親のうち1個は**neo**遺伝子に属するヘテロ接合体であると考えられる。

各種ロットの内100個以下の種を、長さ5 μ の平行な5列に置いた。個々の植物は0.25 μ 離れており、列間の距離は1 μ であった。実験植物の10列の内、対照として形質転換していないH99が1列、形質転換していないPa91植物が1列入っていた。1区画は、対照を含むF1及びF2実験植物からなっていた。これらの区画の各々は、

- i) 1 μ 離れの通路及び
 - ii) 形質転換していないトウモロコシ植物(Variety Sanor)
 - iii) 3列(1 μ 離れている)
- により囲まれていた。

実験区画を調製し、種を播き、次いで以下の表2に記載の計画に従って保持した。種播きに関しては、植物の穴は、プラントスティックで開け、4~5cmの深さに手で種を入れた。

圃場試験は、実験植物の穂軸(cobs)全体を手で除去し、続いてスチームすることにより終了した。残りの植物は、刈り取り機で機械的に切り刻んだ。

以下の観察を実施した。2～3葉段階で、発芽した種の総数を各種ロット毎に数えた。以下の表3に見られるように、種ロットP4482で種の42%しか発芽しなかったことを除いては、発芽率は63～100%であった。形質転換していないH99及びPa91植物の種ロットの発芽率は、25～75%であった。

3～4葉段階で、トランスジェニックneo遺伝子の表現型を以下のようにアッセイした。各植物に対して、小さなはさみで2枚の葉に葉脈の途中までの切れ目を入れた。次いで切れ目を、4%カナマイシン及び0.2% SDSの水懸濁液に浸した1片の綿花で拭いた。幾つかの植物は、5%カナマイシン及び0.1% SDSの水懸濁液で処理した。新しく形成した葉が黄変したら、その植物は感受性であり、活性neo遺伝子を欠損していると記載した。新しく形成した葉が正常で脱色していなかったら、その植物は耐性があり、活性neo遺伝子を保持していると記載した。新しく形成した葉の脱色は、試ってから約10日後に評価した。試験した植物の5～8%は、感受性または耐性であるとはっきりと記載できず、中間の表現型を有していた。これは、最適なカナマイシン(及び/またはSDS)濃度以下であること及び試験した

植物の環境条件及び/または生長段階での変動に依存するものと考えた。

後段の分析に於いて、中間の表現型は感受性の植物と一緒にプールした。各交雑または自家授粉に関するカナマイシン耐性植物対カナマイシン感受性植物(中間表現型を含む)の比は、neo遺伝子の1遺伝子座のメンデルの分離の法則を仮定した場合の適応試験のchisquare goodness[Snedecor and Cochran(1967) "Statistical Methods", Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A.]により決定した。結果を以下の表3に要約する。

表3のデータから、導入されたneo遺伝子は、自家授粉、戻し交雑または、関連しない系との異系交雑から得られたかに関係なく、3世代にわたって安定であった。分離のパターンは、neo遺伝子の密接に結合した活性コピーをたった1個または複数有する各々の元の形質転換体及び、通常のメンデルの1遺伝子座の遺伝的性質を有するneo遺伝子形質と一致した。

母の場合に於いて、実験植物は、形質転換していない対照の植物と比較すると、形態学的に全く正常であった。

表 1

	交 雑	種ロット
F1	H99×H99-M148-1	P3186
	Pa91×H99-M148-1	P3189
	H99×Pa91-M146-2	P3182
	Pa91-M146-2の自家授粉	93173(1)
F2	P3189-024×H99	P3651
	P3166-002の自家授粉	P3989
	P3166-012×H99	P3983
	P3166-018×H99	P3982
	P3173-003の自家授粉	P3996
	P3162-017×H99	P4004
F3	P3162-008×Pa91	P4008
	H99×(P3186-005×H99)-001	P4481
	H99×(P3162-004×H99)-011	P4483
	(P3166-001の自家授粉)-003の自家授粉	P4482
	Pa91×(P3169-028×Pa91)-004	P4310
	H99×(P3169-036×H99)-003	P4306

(1) 試験を実施せず

表 2

月 日	活 動	量
1991年 3月29日	土壌の石灰処理	2000kg/ha
1991年 5月23日	NH ₄ NO ₃ 処理	740kg/ha
1991年 5月23日	過リン酸塩処理	833kg/ha
1991年 5月23日	硫酸カリウム	120kg/ha
1991年 5月27日	F1及びF2 種ロットの種撒き	—
1991年 7月 4日	除草剤処理:	
	Laddok	4 l/ha
	パラフィン油	105 l/ha
1991年 7月 8日	F3 種ロットの種撒き	—
1991年 7月26日	殺虫剤処理:	
	Fyrimor	0.265kg/ha
	Ambush	0.133 l/ha
1991年10月10日	終 了	—

表 3

	コード	Emerg	%	T	R	I	S	ND	X ²	信号
F1	P3169	16/20	5	18	5	6	4	1	1.87	n.s.
	P3166	79/100	4	79	38	0	35	8	0.01	n.s.
	P3162	86/100	4	84	47	1	81	3	2.85	n.s.
F2	P8651	65/100	4	62	28	11	16	9	0.02	n.s.
	P3989	91/100	4	83	66	1	10	5	4.71	P<0.05
	P2983	36/40	4	34	17	2	14	1	0.03	n.s.
	P3982	51/80	4	42	20	4	17	1	0.02	n.s.
	P3998	54/60	4	48	32	0	11	5	0.01	n.s.
	P4004	92/100	4	88	38	11	31	6	0.20	n.s.
F3	P4008	20/20	4	18	6	9	3	0	2.00	n.s.
	P4481	72/100	5	68	32	2	30	2	0	n.s.
	P4483	68/100	5	47	22	2	23	0	0.19	n.s.
	P4482	42/100	5	34	30	0	4	0	8.18	n.s.
	P4310	84/100	5	82	50	7	24	1	4.48	P<0.05
	P4308	85/100	5	79	39	1	39	0	0.01	n.s.

コード=種ロット(表1参照); Emerg=苗木数/播いた種の数;
 % = はけ分析で使用した溶液中のカナマイシン%;
 T = 試験した植物の総数; R = カナマイシン耐性植物数;
 I = 中間表現型の数; S = カナマイシン感受性植物数;
 ND = 苗木が生長停止し枯死したため実施できなかった試験植物数
 $X^2 = R$ 対 $I + S$ の分離の法則に関する chi-square 値
 (1) 遺伝子座分離であると仮定した場合
 異系交雑に於ける予測値は、50% R - 50% I + S;
 自家授粉に於ける予測値は、75% R - 50% I + S)

欧州特許出願番号90403332.1, 1990年11月23日

(2) 配列番号: 1 の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 型: 核酸
 (B) 長さ: 5399bp
 (C) 鎖の数: 二本鎖
 (D) トポロジー: 環状

(ii) 配列の種類: pDE108:

E. coli 中に複製可能なプラスミド DNA

(ix) 特徴:

- 1-451: pUC 誘導配列
 452-1284: カリフラワーモザイクウイルス単離物
 Cabbb-JI から誘導した "35S3" プロモーター配列
 1285-2100: ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子のコード配列
 2101-3180: *Agrobacterium* T-DNA オクトピンシンターゼ遺伝子から誘導したポリアデニル化部位を含む 3' 調節配列
 3181-5399: pUC18 誘導配列

配列表

(1) 一般情報:

(i) 出願人: PLANT GENETIC SYSTEM N.Y.

(ii) 発明の名称:

単子葉植物を形質転換する方法

(iii) 配列の数: 4

(iv) 連絡先:

(A) 住所: Plant Genetic Systems N.Y.

(B) 通り: Plateaustraat 22.

(C) 郵便番号及び市: 9000 Ghent,

(D) 国: ベルギー

(v) コンピューター読取可能形式:

(A) 媒体の種類: 5.25 インチディスク, DS, 高密度
 1.2 Mb フロッピーディスク

(B) コンピューター: IBM PC/AT

(C) 操作システム: DOS Version 3.3

(D) ソフトウェア: WordPerfect

(vi) 本出願データ:

(vii) 優先権出願データ:

欧州特許出願番号91401888.2, 1991年7月8日

他の情報: プラスミドは *E. coli* 中で複製可能であり、バクテリアにアンピシリン耐性を与える

(xi) 配列の説明

TGGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG 50
 GAGACGGTCA CAGCTTGTCT GTAAGCGCAT GCGCGGAGCA GACAGCGCCG 100
 TCAGGGCGCG TCAGCGCGTG TTGGCGGGTG TCGCGGCTGG CTAACTATG 150
 CGGCATACGA CGCATATTGA CTGAGAGTGC ACCATATGCG GTTGGAATA 200
 CGGCACAGAT CGCTAAGGAG AAAATACCGC ATCAGGCGCC ATTCGCCATT 250
 CAGGCTCGCG AACTGTGGG AAGCGCGATC GTTGGCGGCC TCTTCGCTAT 300
 TACGCCAGCT GCGGAAAGGG GGATGTGCTC CAAGCGGATT AAGTTGGGTA 350
 ACGCCAGGGT TTTCCCGAGTC ACGACGTTGT AAAACGACGG CCAGTGAATT 400
 CGAGCTCGGT ACCCGGGGAT CCTCTAGAGT CGAGCTGCAG GCATGCAAGC 450
 TCCCTACGCG CAGGTCTCAT CAAGACGATC TACCGAGTCA ACACTTCCA 500
 GGAGATCAAA TACCTTCCCA AGAAGGTAA AGATGCACTC AAAGATTCA 550
 GGAATCAATT CATCAAGAAC ACAGAGAAAG ACATATTCTC CAAGATCAGA 600
 AGTACTATTC CAGTATGGAC GATTCAAGGC TTGCTTCATA AACCAAGCCA 650
 AGTAATAGAG ATTGGAGCTT CTAAAAAGGT AGTTCTTACT GAATCTAAGC 700
 CCATCGATGG AGTCTAAGAT TCAAAATCGAG GATCTAACAG AACTGCGCGT 750
 GAAGACTGGC GAACAGTTCA TACAGAGTCT TTTACGACTC AATGACAGA 800
 AGAAAAATCTT CGTCAACATG GTGGAGCACG ACATCTGTGT CTACTCCAAA 850
 AATGTCAAAAG ATACAGTCTC AGAAGACCAA AGGCTATTG AGACTTTCA 900
 GTCACTTCAT CGAAAAGGACA CTAGAAAAGG AAGTGGCTC CTACAAATGC 950
 CATCTATTGG ATAAAGGAAA GGCTATCAAT CAAGATGCCCT CTGCGGACAG 1000
 TGCTCCCAAA GATGACCCCG CACCCACGAG GAGCATCGTG GAAAAAGAAG 1050
 ACGTTCCAAC CAGCTCTTCA AAGCAAGTGG ATTGATGTGA CATCTCCACT 1100
 GACGTAAAGG ATGACGCACA ATCCCACTAT CTTTCGCAAG ACCCTTCTCT 1150
 TATATAAGGA AGTTCTATTC ATTTGGAGAG GACAGCTGAT AATCAAGAT 1200
 CTCTCTCTAT AAATCTATCT CTTCTCTAT AACCATGAT CCGGCCAAGC 1250
 TAGCTTGGAT TGAACAAGAT GGATTGCAGC CAGGTTCTCC GCGCGCTTGG 1300

GTGGAGAGGC TATTEGGCTA TGACTGGGCA CAACAGACAA TCGGCTGCTC 1400
 TGATGCGGCG GTGTTCGGGT TGTACGGGCA GGGGCGCGCG GTTCTTTTTG 1450
 TGAAGACCGA CCGTTCGGGT GCGCTGAATG AACTGCAGGA CGAGCGAGCG 1500
 CGGCTATCGT GGTTGGGCAAG GAGCGGGGCT CCGTTCGGGT GCGTTCGGGT 1550
 CGTGTCACT GAGCGGGAAG GCGGCTGCTG GCTATTCGGG GAGTGGCGCG 1600
 CGGAGGATCT CCGTGTCACT CAGCTTGGCTG CCGCGGAGAA AGTATTCGATC 1650
 ATGGCTGATG CAATGCGGGG GCTGCATACG CTTGATCGCG CTAGCTGCGC 1700
 ATTCCAGCAC CAAGCGAAGC ATGGCATCGA CGGAGCACGT ACTCGGATGG 1750
 AAGCGGCTCT TGTGATCGAG GATGATCTGG AGGAGAGGCA TCGGGGCTC 1800
 GCGGCGAGCG AACTGTTGGG CAGGCTCAAG CGGCGGATGC CGGACGGGGA 1850
 GGAATCTGCT GTGACCGATG GCGATCGCTG CTTGCGGAAT ATCATGTGGG 1900
 AAAATGCGCG CTTTTCGGGA TTCAATCGACT GTGGCGGGCT GGGTGTGGCG 1950
 GACCGCTATC AGGACATAGC GTTGGCTACG CGTGATATGG CTGAAGAGCT 2000
 TGGCGCGGAA TGGGCTGAGC GGTTCCTGCT GCTTACCGGT ATCGCGCTC 2050
 CGGATTCGCA GCGCATCGCC TTCTATCGCC TTCTTACGGA GTTCTTCTGA 2100
 GCGGATCTCT GGGGTCGAA ATGACCGAGC AAGCGAGCGC CAACCTGCGA 2150
 TCACGAGATT TCGATTCCAC GCGCGCGCTT TATGAAGGT TGGGCTCGG 2200
 AATCGTTTTC GGGGACGCGC GCTGGATGAT CCTCCAGCGC GGGGATCTCA 2250
 TCGTGGAGTT CTTGCGCCAC CCGCTGCTTT AATGAGATAT GGGAGAGCGC 2300
 TATGATCGCA TGATATTTGG TTCAATTTCT GTTGTGCGAG TTGTAAGAAA 2350
 CCGAGCATGT TGTAGCTTCA ATGCTTACCG CCGGTTTCGG TTCTTCTTAA 2400
 TGAATATATC ACCGCTTACT ATCGATTTTT TATGAATAT ATTCTGCTT 2450
 CAATTTACTG ATTGTACCGT ACTACTTATA TGTACAATAT TAAATTAAGA 2500
 ACAATATATT GTGCTGAATA GGTATTATAG GACATCTATG ATAGAGCGCC 2550
 ACAATTAACA ACAATTCGCT TTATATATTA CAATTCGAAT TTAAAAAATA 2600
 CGCGGAGAAC CGGTTCGAA TAAAGAGCTG ATTACATAAA TCTTATTCAA 2650
 ATTTCAAAAG GCGCCAGGGG CTAGTATCTA CGACACACCG AGCGGCGGAA 2700
 TAATAACGTT CACTCAAGGG GACCTCGGTT CCGCGCGCGC GCGCATGGGT 2750
 GAGATTCTCT GAAGTTGAGT ATTGGCGCTC CGCTCTACCG AAGTTTACGG 2800
 GCGCATTTCA ACCCGGTTCA GCACGCGCGC CCGGTTCGCG ACTTGTCTGC 2850
 CCGGAGATTA TCGAGCATTT TTTGGTGTGA TGTGGGCGCG AATGAAGTGG 2900
 CAGCTCAAAAT AACATGTCGA GGTCTGAGCG GGGCTCGATC CCGTTCGCGG 2950
 ATTGTGCGAC AACATGTCGA GGTCTGAGCG GGGCTCGATC CCGTTCGCGG 3000
 TTGGTTCAGC TGTGCTGCGA GGTCTGAGCG GGTCTCGATC CCGTTCGCGG 3050
 AGTGCAGAAC CCGTTCGCGA CAGGAGAAC GCGAGCGGTA TCGTTCGCGG 3100
 CATGCGCGCG AACTGCGAGG GTGGGAGGCG AGGATGGGCG CTTTGTGCGA 3150
 CCGTGCAGCA AGCTTGGCGT AATCAATGTC ATAGCTGTTT CCGTGTGAAA 3200
 ATTGTATATC GCTTCAAAAT ATGAGTGAGG TAACTACAT TAAATTCGCT 3250
 TGTAAAGCTT CCGTTCGCGT ATGAGTGAGG TAACTACAT TAAATTCGCT 3300
 CGGCTCACTG CCGCTTTCG AGTGGGAGAA CCGTGTGCGT CAGTGTGCTT 3350
 AATGAATCGG CCAAGCGCGC GGGGAGGCGG GTTTCGCTAT TGGGCGCTCT 3400
 TCGGCTTCTT CCGTCACTGA CCGGCTGCGC TCGGCTGCTT GCGTTCGCGG 3450
 AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGCGGCTTAT CCGGCTTATC ACAAGATCAG 3500
 GGGATAACCG AGGAGAGAAC ATGTGAGGCA AAGGCGGAGC AAGGCGGAGG 3550
 AACCGTAAAA AGCGCGCGCT CCGGCTGCTT TCGATAGGCG TCGGCGCGCG 3600
 TACGAGCAT CAGAAATATC GAGGCTGAGG CCGGAGGAGC CCGGAGGAGC 3650
 CAGGACTATA AGATATCCAG GCGTTTCCCG CTGGAAGCTC CCGTGTGCGG 3700
 TCTCTGCTTC CGACCGCTGC GCTTACCGGA TACGCTGCGC CCGTGTGCGG 3750
 TTCGCGAAGC GTGGCGGCTT CCGAATGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT 3800
 CCGGTAGAGT CCGTTCGCTC AAGCTGGGCT GTGTGACGGA ACCCGCGGTT 3850
 CAGCGCGAGC CCGTTCGCTT ATCGGCTTAA TATCGCTTGG ATTCGAAACCG 3900
 GGTAAAGCAC GACTTATCGC CACTGGGAGC AGCGACTGGT AACAGGATTA 3950
 GCAGAGCGAG GTATGTAGCG GTGCTACAG AGTCTTGAAG GTGCTGCGT 4000
 AACTACGGCT AACTAGAAAG GACATATTG GTTATCGCG CCGTGTGCGG 4050
 GCGAGTTACC TTGCGAAAAA GAGTTGTAGT CTCTGTATCC GCGAAACAAA 4100

CGACGGCTGG TAGCGGTGGT TTTTCTGTTT GCAAGGAGCA GATTACGCGC 4150
 AGAAAAAAGG GATCTCAAGA AGATCTTTTG ATCTTTCTTA CGGGGTCTGA 4200
 CGCTCAGTGG AACGAAAAC CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT 4250
 CAAAAAGGAT GTTACCTTAG ATCGTTTATA ATTAATAATG AAGTTTAAA 4300
 TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCTT 4350
 AATCAGTGAAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTCTGT TCATCCATAG 4400
 TTGCTGTGCT CCGCGCTGCT TAGATACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA 4450
 TCTGCGCGCA GTGCTGCAAT GATACCGGGA GACCGAGGCT CACCGGCTCC 4500
 AGATTATATC GCAATAAAC AGCGAGCGCG AAGGCGGAG CCGGAGAGTG 4550
 GTCTGTGCAAG TTTATCGCG TCCATCCAGT CTATTAAATG TTGCGGGA 4600
 GCTAGAGTAA GTAGTTCGCG ACTTAAATAG TTGCGCAAGC TTGTTGGCAT 4650
 TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTGTGATG GCTTCAATCA 4700
 GCTCGCGGTC CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC 4750
 AAAAAAGCGG TTAGCTCTCT CCGTCTCTCG ATCGTTGTCA GAGTAAGTT 4800
 GGGCGGAGTG TTATCACTCA TGGTTATGCG AGCACTGCAT AATCTCTTAA 4850
 CTGTCTATGC ATCCCTAAGA TGCTTTCTG TGACTGGTGA GTACTCAACC 4900
 AAGTCATTCT GAGAAATAGT TATGCGGCGA CCGAGTTGCT CTTGCGCGCG 4950
 GTCAATACGG GATAATACCG CCGCACATAG CAGAACTTTA AAGTGTCTCA 5000
 TCATTGGAAA ACCTTTCTCG GGGCGAAGC TCTCAAGGAT CTTACCGCG 5050
 TTGAGATCCA GTTCGATGTA ACCCACTCTT GCACCAACT GTCTCTCAGC 5100
 ATCTTTACT TTACAGGCG TTCTGTGGTG AGCAAAACCA GGAAGGCAAA 5150
 ATGCGGCAAA AAGGGAATA AGGCGGAGC GGAATGTTG AATAGTCATA 5200
 CTCTCTCTTT TTCAATATTA TTGAAGCAT TATCAGGCTT ATGTCTCAT 5250
 GAGCGGATAC ATATTGAAAT GTATTTAGAA AATAAACAAT ATAGGCGGTT 5300
 CGCGGACATT TCGCGGAAAA GTGCGACCTG ACCTCTAAGA AACCATATT 5350
 ATCATGATCT TAACTATAA AATAGGCGT ATCAGGAGCG CTTTTCGTC 5399

(3) 配列番号: 2 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 型: 核酸

(B) 長さ: 1186bp

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 直鎖

(ii) 配列の種類: neo 遺伝子に対するプロンプとして使

用した DNA:

(ix) 特徴:

1-8: *Nicotiana glauca* の芽胞特異的プロ

モーターから誘導した配列

9-790: ネオマイシンホスホトランスフェラー

セ遺伝子のコード配列

791-終: *Agrobacterium* T-DNA 遺伝子 7 から誘導

したポリアデニル化部位を含む 3' 脚節

配列

(xi) 配列の説明

AAGCTTGGAT GGATTGCAGC CAGGTTCTCC GCGCGCTTGG GTGGAGAGGC 50
 TATTGCGGCTA TGAATGCGCA CAACAGACAA TCGGCTGCTC TGATGCGGCG 100
 GTGTTCGGCG TGTACGGGCA GGGGCGCGCG GTTCTTTTTG TGAAGACCGA 150
 CCGTTCGGGT GCGCTGAATG AACTGCAGGA CGAGCGAGCG CCGGCTATCGT 200
 GCGTGGCGAC GACCGGCGGT CCGTTCGGGT CCGTGTCTGA CCGGCTATCGT 250
 GAAGCGGGAA GGGACTGGCT GCTATTGGCG GAGATGCGCG GCGAGGATCT 300
 CCGTGTCTCT CACCTTGTCT CTGCGGAGAA AGATATCAAT ATGCTGATG 350
 CAATGCGGCG GCTGCATACG CTTGATCGCG CTACCTGCGC ATTGAGCAC 400
 CAAGCGAAGC ATGCGATCGA CCGAGCACGT ACTCGGATGG AAGCGGCTCT 450
 TCTGATCAG GATGATCTGG ACCAGAGGCA TCGGCGGCTC GCGCGAGCGC 500
 AACTGTCGCG CAGGCTCAAG CCGCGGATGC CCGAGCGGGA GGAATCTCTC 550
 GTGACCGATG GCGATGCGTG CTTGCGGAA ATCATGTTGG AAAATGGGCG 600
 CTTTTCTGGA TTGATCGACT GTGGCGCGCT GGGTGTGGCG GACCGCTATC 650
 AGGACATAGC GTTGGCTACC CCGTATATTT CTGAAGAGCT TGGCGGCGAA 700
 TGGGCTGAGC GCTTCTCTGT GCTTATCGGT ATCGCGCTC CCHATTGCGA 750
 GCGCATCGCG TTCTATCGCG TTCTTCTGGA GCGGAGCTCT 800
 GGGGTTGCAA ATGAGCGAGC AAGCGAGCGC CAACCTGCGA TCAGGAGATT 850
 TCGATTCCAC CCGCGCTTTC TATGAAGGT TGGGCTTCGG AATCGTTTT 900
 CCGGAGCGCG GCGGATGAT CCGTCCAGCG GGGGATCTCA TCGTGAAGTT 950
 CTTGCGCGAC CCGGATCCAT GAGCTAAGCT AGCTATATCA TCAATTTATG 1000
 TATTAACAT ATATTCGAC TCACTCTTTC ATCTACGCGA ATTGAGCAGC 1050
 TGATATATC AGTATTGAA ATATTCTGTA ATTTAACTT GCATCAATAA 1100
 ATTTATGTTT TTGCTTGGAC TATAATACCT GACTTGATT TTATCAATA 1150
 AATATTAAAA CTATATTCT TTCAAGATGG GAAATC 1186

(4) 配列番号: 3 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 型: 核酸

(B) 長さ: 1287bp

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 直鎖

(ii) 配列の種類: キメラ遺伝子を含むDNA

(ix) 特徴:

- 1-545: *Nicotiana tabacum*からのTA29遺伝子
からのプロモーター
- 546-881: barnase遺伝子のコード配列
- 882-: *Agrobacterium* T-DNAからのノバリン
シンターゼ遺伝子から誘導したポリア
デニル化部位を含む3'調節配列

(xi) 配列の説明

```

ATCTAGCTAA GTATAACTGG ATAAATTTGCA TTAACAGATT GAATATAGTG 50
CBAACACAGA AGGACCAATT GACTGTCTAC TTTATGAAAG ATGATTGAAA 100
CATGATTTTT TATCTACTAA TATATACATC CTACTCGAAT TAAAGCGACA 150
TAGGCTCGAA GTATGCACAT TTAGCAATGT AAATTAATC AGTTTTTGAA 200
TCAAGCTAAA AGCAGACTTG CATAGGGTGG GTGGCTGGAC TAGAATAAAC 250
ATCTCTCTTA GCACAGCTTC ATAATGTAAT TTCCATAACT GAAATCAGGG 300
TGAGACAAAA TTTTGGTACT TTTTCTTCC ACTAAGTCCA TGTTTGCAAC 350
AAATTAATAC ATGAAACCTT AATGTTACCC TCAGATTAGC CTGCTACTCC 400
CCATTTTCTT CGAAATGCTC CAACAAAAGT TAGTTTTGCA AGTTGTTGTG 450
TAATGTTTGT GCTCTATATA TGGCTTTGTG GTGCAAGTGT AACAGTACAA 500
CAATCATCACT GAAATCAAG TTTTACTCTA AAGAAATTAG CTACCATGGT 550
ACCGTTATTC AACAGCTTTG ACGGGGTTGG GGATTATCTT CAGCATATTC 600
ATAAGCTACC TGATAATTAC ATTAACAAAT CAGAAAGACA AGCCCTCGGC 650
TGSGTGGGAT CAAAAGGCAA CCTTGCAGAC GTCCGTCCGG GGAAGAGCAT 700
CGGCGGAGAC ATCTTCTCAA ACAGGGAAGG CAAACTCCGG GGCAGAAAGC 750
GACGACACAT GCGTGAAGCG GATATTAACT ATACATCAGG CTTCAGAAAT 800
TCAGACCGGA TTCTTTACTC AAGCGACTGG CTGATTTACA AAACAACCGA 850
CCATTATCAG ACCTTTTACA AAATCAGATA ACGAAAAAAA CGGCTTCCTG 900
CGGAGGCGGT TTTTTCAGG TTACATATAA GTTGTATAA ATTTTCTCTT 950
CAAACTCTGA TCGCTCAATT TCACTTCCGG GXXXXCTCTA GAGCATCCGA 1000
ACGAGATCGT TCAAACTTTT GGCAATAAAG TTCTTTAAGA TTGAATCTG 1050
TTGCGGGTCT TGCGATGATT ATCATATAAT TTCTGTTGAA TTAGCTTAAG 1100
CATGTAATAA TTAACATGTA ATGCATGACG TTATTTATGA GATGGTTT 1150
TATGATTTAG GTCCCGCAAT TATACATTTA ATACGCGATA GAAAAAATA 1200
TATAGCGGCG AACTATAGG AAATATTCGC GCGCGGTGTC ATCTATGTTA 1250
CTAGATCGGG AAGATCCCCG GGTACCGAGC TCGAATT 1287

```

(5) 配列番号: 4 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 型: 核酸

(B) 長さ: 4883bp

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 環状

(ii) 配列の種類: pDE110:

*E. coli*中で複製可能なプラスミドDNA

(ix) 特徴:

- 1-395: pUC18誘導配列
- 396-1779: カリフラワーマゼイクウイルス単離物
Cabb-B-JIから誘導した"35S3"プロモ
ーター配列
- 1780-2331: ホスフィノトリシンアセチルトランス
フェラーゼ遺伝子のコード配列
- 2332-2819: *Agrobacterium* T-DNAノバリンシンター
ゼ遺伝子から誘導したポリアデニル
化部位を含む3'調節配列
- 2820-4883: pUC誘導配列
- 他の情報: プラスミドは*E. coli*中で複製可能で

あり、バクテリアに対するアンピシリ
ン耐性を与える

(xi) 配列の説明

```

TCGGCGGTTT CGGTGATGAC GGTGAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG 50
GAGAGGGTCA CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCGCGGAGCA GACAAAGCCC 100
TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGCTCGG CTTAACTATG 150
CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC ACCATATGGG GTGCAATA 200
CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATAGCGG ATCAGGCGCC ATTGCGCAAT 250
CAGGCTGCGC AACTGTTGGG AAGGGCGATC GGTGCGGGCC TCTTCTCTAT 300
TAGCGCAGCT GCGGAAAGGG GGAATGCTGG CAAAGCGGAT AAGTTGGGTA 350
ACGCCAGGTT TTTCCAGTTC ACGAGCTTGT AAAACBACGG CCGTGAAT 400
CGAATCGGTT ATTCAACACC CTGATACCAA CTACTACGTC GTGTATAACG 450
GACCTGATGC CGGTATATAC GATGACTGGG GTTGTACAAA GGCAGCAACA 500
AAGAGCAGCA GCTGACCGGT ATACAAACAG TCAGCAAAAC GATAGGTTGA 550
ACTTCATCCC CAAAGGAGAA GCTCAACTCA AGCCCAAGAG CTTTGCAGAG 600
GCGCTAACCA GCGCAACAAA GCAAAAGGCC GAGATCTCCT TTGCCCCGGA 650
AJAAGGCCCA GCACTGATCC AGCCCCAAA GAGATCTCCT TTGCCCCGGA 700
GATTACAATG GACGATTTCC TCTATCTTTA CGATCTAGGA AGGAAGTTCC 750
AAGGTGAAGG TCAGCAGACT ATGTTCCACC CTGATAATGA GAAGGTTAGC 800
CTCTTCAATT TCAGAAAGAA TGCTGACCCA CAGATGGTTA GAGAGGCCTA 850
CGCAGCAGGT CTGATCAAGA CGATCTACCC GAGTAACAA CTCCAGGAGA 900
TCAAAATACCT TCCCAAGAGG GTTAAAGATG CAGTCAAAA ATTGAGGACT 950
AATTGCATCA AGAACAAGA CAAAGACATA TTTCTCAAGA TCAGAACTAC 1000
TATTTCAGTA TGACGATTC AAGGCTTGCT TCATAAACCA AGCGAAGTAA 1050
TAGAGATTGG ACTCTCTAAA AAGGTAGTTC CTACTGAATC TAAAGCCATG 1100
CATGGAGTCT AAGATTCAAA TCGAGGATCT AACAGAACTC GCGCTGAAGA 1150
CTGGCGAACA GTTCATACAG AGTCTTTTAC GACTCAATGA CAAAGAGAAA 1200

```

ATCTTCGTCA ACATGGTGA GCACGACACT GTGGTCTACT CCAAAAATGT 1350
 CAAAGATACA GTCTCAAGAG ACCAAAGGGC TATTGAGACT TTTCAACAAA 1400
 GGATAATTTT GGGAAAGCTC CTGGGATTCC ATTGCCGAGC TATCTGTAC 1450
 TTCAATCGAAA GGACAGTAGA AAAGGAAGGT GGCTCTTACA AATGCCATCA 1500
 TTGGGATAAA GGAAGGGCTA TCAATTCAAG TGGCTCTGCC GACAGTGGTC 1550
 CCAAGCAGTG ACCCCACACC ACAGAGGAGA TCGTGGAAAA AGAAGACGTT 1600
 AAGGAGACGT CTTCAAGCA AGTGGATTGA TGTGACATCT CCACGTGAGT 1650
 AAGGAAGCTT ATTTCATTTG GAGAGGAGCA GCTGAAATCA CGAGTCTCTC 1700
 TCTATAAATC TATCTCTCTC TCTATAACCA TGGACCCAGA ACAGCGCCCG 1750
 GCGGACATCC GCGCTGCCAC CGAGGCGGAC ATGCCGCGCG TCTGACCATC 1800
 CGTCAACAC TACATCGAGA CAAGCAGCGT CAATCTCCGT ACCGAGCCCG 1850
 AGGAACCGCA GGAGTGGAGC GACGACCTCC TCCCTCTGCC GGAAGCGTAT 1900
 CCGTGGCTCG TCGCGAGGT GAGCGCGAG GTCCGCGGCA TCGCTTACGG 1950
 GCGCCCGCTG AAGGCAACCA ACGCCATCCA CTGGACGGCC GAGTGGACGG 2000
 TGTACGTCTC CCGCCGCGAC CAGCGGAGCG GACTGGGCTC CAGGCTTAC 2050
 ACCCAGCTGC TGAAGTGGCT GAGGCGCAGC GCTCTCAAGA GCTGTGCTCG 2100
 TGTCTGCGG CTGCGCGAGC ACCGAGCGCT GCGCATGCA GAGCGCTCC 2150
 GATATGCCCC CCGCGGATG CTGCGGCGCG CCGGCTTCAA GCACGGCAAC 2200
 TGGGATGAGC TGGGTTCTG GCGAGTGGAC TTCAGGCTGC CGGTACCGCC 2250
 CCGTCCGCTC CTGCGCGTCA CCGAGATCTG ATCTCAGCG TTAGGATCC 2300
 GAAGCAGATC GTTCAACAT TGGCAATAA AGTTCTTAA GATTGAATCC 2350
 TGTTCGCGGT CTTCGATGA TATCATATA ATTTCTGTTG AATTACGTTA 2400
 AGCATATAAT AATTAACTG TAAATGATCA CGTTATTAT GAGATGGGTT 2450
 TTTATGATTA GAGTCCCGCA ATTATACATT TAATACGCGA TAGAAAAACA 2500
 AATATAGGCG GCAAACTAGG ATAAATTCT GCGCGCGTGA TCAATATATG 2550
 TACTAGATCG GGAAGATCT CTAGATGCGA CCGCAGGCA TCGAAGCTTG 2600
 GCGTAATCAT GGTATAGCT GTTTCCTGTG TGAATTTGTT ATCCGCTCAC 2650
 AATTCCACAC AACATACGAG CCGGAAGCAT AAAGTGTAAA GCTGGGGGTG 2700
 GCTAATGAGT GAGCTAACCT ACATTAATTG CGTTGCGCTC ACTGCCCGCT 2750
 TTCCAGTCGG GAAACCTGTC GTGCCAGCTG CATTAATGAA TCGGCCAACG 2800
 CCGGGGGAGA GCGGGTTTGC GTATTGGGCG CTCTTCCGCT TCTCGCTCA 2850
 CTGACTCGCT CCGCTCGGTC GTTCGGCTGC GCGGAGCGGT ATCAGCTCAC 2900
 TCAAGGCGCG TAATACGGTT ATCCACAGAA TCGAGGATA ACACGAGAAA 2950
 GAACATGTGA GCAAAAGGCC AGCAAAAGCC CAGCAACCGG AAAAAAGCCG 3000
 CTTTCTCGCG GTTTTTCAT AGGCTCCGCC CCGCTCAGGA GCATCACAAA 3050
 AATGAGCGCT CAAGTCAGAG GTGCGGAAAC CCGACAGGAC TATAAGATA 3100
 CGAGGCGGTT CCGCTCGGAA GTCCTCTCGT CCGCTCTCCT GTTCCGACCC 3150
 TCGCGCTTAC CGGATACCTG TCGCGCTTTC TCGCTTCGGG AAGCGTGGCG 3200
 CTTTCTCAAT GCTCACGCTG TAGGTATCTG AGTTCGCTGT AGGTCGTTGG 3250
 CTCCAAGCTG GCGCTGCTGC ACAGAACCCC CTTTCAGCCC GACGCTGCTG 3300
 CTTATCCGG TAACATAGCT CTTAGTCCA ACCGCTTAAJ ACACGACTTA 3350
 TCGCACTCG CAGCAGCCAC TGGTAACAG ATTAGCAGAG CGAGGTATGT 3400
 AGGCGGCTCT ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG GCTTAACAC GGTATACATA 3450
 GAAGGAGAGT ATTTGGTATC TGGCTCTCTG TGAAGCCAGT TACCTTCGGA 3500
 AAAAGAGTTG TAGCTCTTG ATCCGCGCAA CAAACCAACG CTGGTAGCGG 3550
 TGGTTTTTTT GTTTCGAAGC AGCAGATTAC GCGCAGAAAA AAAGGATCTC 3600
 AAGAAGATCC TTGATCTTT TCTACGGGGT CTGACGCTCA GTGAAGCGAA 3650
 AACTCAGCTT AAGGAGTTTT GGTATGAGA TTATCAAJAA GATCTCTCAC 3700
 ATGATTAAC TTGGTCTGAC AGTTACCAAT GCTTAATCAG TGAGGCACCT 3750
 ATCTCAGGGA TCTCTCTATT TCGTTTATCC ATAGTTCGCT GACTCCCCGT 3800
 CCGTAGATA ACTACGATAC GGGAGGGGCT ACCATCTGCG CCGAGTGGCT 3850
 CAATGATACC GCGAGACCCA CGCTCACCGG CTCAGATTT ATCAGCAATA 3900
 AACCGGCCAG CCGGAAGGGC CGAGCGCAGA AGTGGTCTCG CAATCTTATC 3950

CGGCTCCATC CAGTCTATTA ATTGTGGCG GGAAGCTAGA GTAAGTAGTT 4100
 CGCCAGTTAA TAGTTTGGCG AACGTTGTTG CCATTGCTAC AGGATCGTG 4150
 GTCTCAGCTT COTCGTTGG TATGGCTTCA TTCAGTCTCG GTTCCCAACG 4200
 ATCAAGGCGA GTTACATGAT CCGCCATGTT GTGCAAAAAA GCGGTTAGGT 4250
 COTTCGGTCC TCGGATCGTT GTGAGAAATA AGTTCGGCGC AGTGTATCA 4300
 CTCTATGTTA TGGCAGCACT GCATAATCT CTACTGTGA TCGCATCGGT 4350
 AAGATGCTTT TCTGTGACT GTGAGTACT AACCAAGTCA TTCTGAGAT 4400
 AGTATATGCG GCGACCGAGT TGTCTTTGCC CCGGCTCAAT ACGGATATA 4450
 ACCGCGCCAC ATAGCAGAAC TTTAAAAAGT CTCATCATTTG GAAACGTTT 4500
 TTGCGGGCGA AAACCTCTCA GGATCTTACC GGTGTGAGA TCCAGTTCGA 4550
 TGTAAACCCAC TCGTGCACCC AACCTGATCT CAGCATCTTT TACTTTTACC 4600
 AGCGTTTCTG GGTGAGCAAA AACAGGAAGG CAAATCCCG CAAAAAGGG 4650
 AATAAGGGCG ACACGGAAAT GTTGAATACT CATACTCTTC CTITTTTCAAT 4700
 ATTATTTAAG CATTATACAG GGTATTGTC TCATGAGCGG ATACATATTT 4750
 GAATGTATTT AGAAAAATAA ACAAAATAGG GTTCCGCGCA CATTTCCCGG 4800
 AAAAGTGCCA CTGACCTCT AAGAAACAT TATTATCATG ACATTAACCT 4850
 ATAAAAATA GCGTATCACG AGGCGCTTTC GTC 4883

FIG. 1

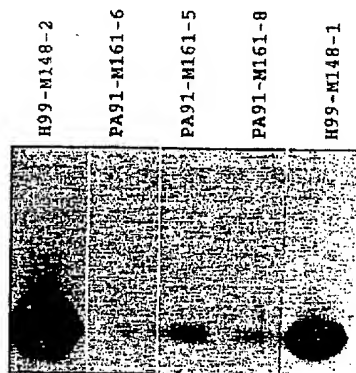


FIG. 2

Blot : λ PstI H3 (NPTII:stx) Exp : 48 hours

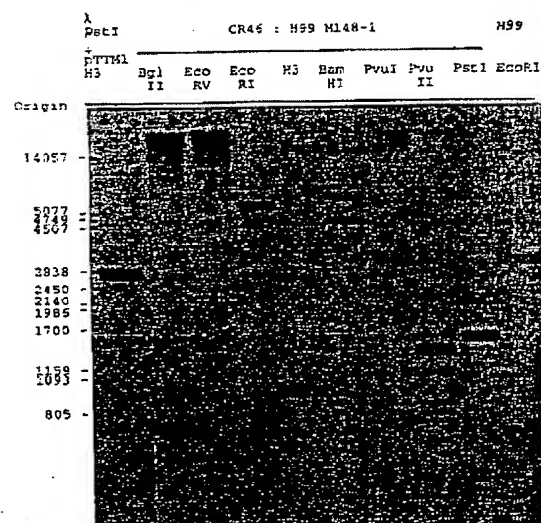


FIG. 3

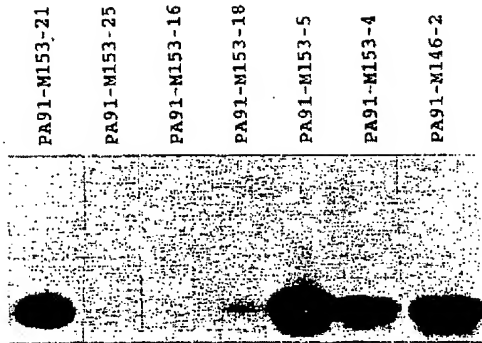
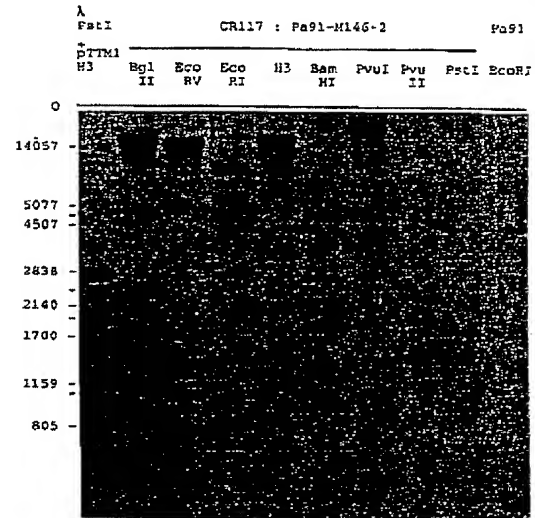


FIG. 4

Mat : 170034 8 7-7 PTM1 E1-H3 (NPT114742)
Exp : 48 hours



國際調查報告

PCT/EP 91/02198

[illegible]

International Applications for

PCT/EP 91/02198

B. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE AVAILABLE			CONTINUED FROM THE SECOND SHEET	Reference to Claims No.
Category	Character of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passage			
Y	EP,A,0 144 029 ("PLANT GENETIC SYSTEMS") 29 November 1989 see claim 12	---		17,18
P,X	DE,A,4 013 099 (HOECHST) 31 October 1991 see page 4, line 19 - line 29	---		1,5,8-16
A	THE PLANT CELL, vol. 2, no. 7, July 1990, ROCKVILLE, MD, USA. pages 591 - 602; DEREYNER, R. A., ET AL.: 'Transient gene expression in intact and organized rice tissues' see page 660, left column, paragraph 2	---		1-16
A	EP,A,0 203 790 (UNIVERSITY OF NOTTINGHAM) 3 December 1986 see claims 1-10	---		1-16
A	DE,A,3 738 874 (INSTITUT BOTANIKI UKRAINSKOJ) 17 November 1988 see example 5	---		1-16

国際調査報告

EP 9102198
SA 53248

This annex lists the patent family members relating to the patent document cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on the European Patent Office. It is to be noted that these members which are merely given for the purpose of information. 18/02/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
NL-A-8801444	02-01-90	None	
EP-A-0334539	27-09-89	AU-A- 3157389 JP-A- 2009376	21-09-89 12-01-90
EP-A-0290395	09-11-88	AU-B- 613905 AU-A- 1550888 JP-A- 61301792	17-10-81 10-11-88 08-12-88
WO-A-8809374	01-12-88	EP-A- 0352244 JP-T- 2503823	11-04-90 01-11-90
EP-A-0344029	29-11-89	AU-A- 3537189 WO-A- 8910396 JP-T- 2501988	24-11-89 02-11-89 22-11-90
DE-A-4013099	31-10-91	FR-A- 2661421	31-10-91
EP-A-0203790	09-12-86	GB-A, B 2176919 JP-A- 61286921	10-12-86 16-12-86
DE-A-3738874	17-11-88	None	

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office No. 12/92

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, NL, S E), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, SN, TD, TG), AU, BB, BG, BR, CA, CS, FI, HU, JP, KP, KR, LK, MC, MG, MN, MW, NO, RO, S D, SU, US